



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ – UFOPA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA – PROPPIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS – PPGBio**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA FORMULAÇÃO
EM GEL DO OLEORRESINA DE *Copaifera duckei* DWYER EM USO
TÓPICO POR FONOFRESE.**

DALIANE FERREIRA MARINHO

Santarém – PA

Outubro/2015

DALIANE FERREIRA MARINHO

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA FORMULAÇÃO
EM GEL DO OLEORRESINA DE *Copaifera duckei* DWYER EM USO
TÓPICO POR FONOFRESE.**

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. ADRIANA CAROPREZO MORINI.

Dissertação apresentado ao Programa de pós-graduação *Stricto-Sensu* Biociências da UFOPA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Santarém – PA

Outubro/2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFOPA
Bibliotecário-documentalista: Mayco Chaves CRB 2/1357

M337a Marinho, Daliane Ferreira
Avaliação da utilização terapêutica da formulação em gel do oleorresina de *Copaifera duckei* Dwyer em uso tópico por fonoforese / Daliane Ferreira Marinho. – Santarém, 2015.
103 f. : il.

Orientadora Adriana Caroprezio Morini.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará. Programa de Pós-Graduação em Biociências. Santarém, 2015.

1. Copaíba – aplicações terapêuticas . 2. Plantas medicinais. 3. Inflamação (Terapia) . 4. Fonoforese. I. Morini, Adriana Caroprezio, *orient.* II. Título.

CDD: 23.ed. 615.321

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA FORMULAÇÃO EM GEL DO
OLEORRESINA DE *Copaifera duckei* DWYER EM USO TÓPICO POR
FONOFORESE.**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em **04 de novembro de 2015**.

Apresentado à Comissão Examinadora integrada pelos professores: Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado (UFPA) e Prof. Dr. Caio Maximino Oliveira (UNIFESSPA)



Adriana Caroprezo Morini (UFOPA)
Orientadora

Santarém, 04 de novembro de 2015

Dedico este trabalho especialmente a minha amada filha Catarina. E também a minha família, meus pais, Elida e Mateus, importantíssimos na minha formação, e aos meus irmãos, Eliane e Mateus filho, que me ajudaram nessa caminhada. A eles dedico mais essa conquista...

AGRADECIMENTOS

À Deus, por contemplar-nos com a vida, dar-nos apoio nos momentos difíceis, proporcionar oportunidades para o nosso crescimento e auxílio na escolha e formação profissional e acadêmica.

A minha família, pelo constante apoio, confiança e amor que sempre me depositaram.

A **Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)**, ao **Programa de pós-graduação em Biociências** e a **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA)**.

A minha orientadora, professora **Dra. Adriana Caroprezo Morini** que muito contribuiu com seus ensinamentos, orientações, contribuições, compreensão e valoroso apoio nesta caminhada.

Aos professores da UFOPA agradeço os ensinamentos e apoios recebidos nessa caminhada. Em especial a **Prof. Dra. Elaine Oliveira** e ao **Prof. Dr. Waldiney Pires**.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Ferreira** e **Prof. Msc. Tiago Silveira**, da Universidade do Estado do Pará, com suas imprescindíveis ajudas, fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao laboratório de Biotecnologia, nas pessoas da prof. Elaine Oliveira e da discente de biotecnologia da UFOPA, **Inaê Ferreira** pela ajuda no fornecimento do OR de *C. duckei* extraído na FLONA. Com agradecimento ainda aos mateiros responsáveis pela coleta na mata.

Aos colegas **Helen Soares, João Oliveira, Jairo Araújo, Inaê Pinto, Éden, Nívia Lopes** e **Caroline Fontinele** que contribuíram voluntariamente nesse trabalho e que foram essenciais para o desenvolvimento do mesmo.

Aos colegas da turma 2013 – Santarém (**Andréa Nunes, Lúcio Thadeu, Juliana Machado, Juliana Almeida, Brena Vinholte, José Jr., Andrea Gibertt, Bárbara, Maria Beatriz, Amanda Azevedo, Suelen Ricarte, Osvaldo Gato, Caroline, Mônica, Thiago Moreira**), do mestrado em Biociências pela companhia alegre durante essa caminhada, responsáveis por suavizar os momentos de tensão que ocorreram no percurso.

Aos meus amigos pelo carinho, paciência e pela amizade em todos os momentos e pelo incentivo nessa caminhada.

E a tantas outras pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a execução desse trabalho: **Dra. Ada** e **Dr. Tales** da Bioativa, a **Prof. Kariane Nunes**, **Prof. Lenise** e ao **Hugo** do Laboratório de química, ao **Ângelo** do Laboratório de morfofisiologia animal e ao **Gilson** do Laboratório de Sanidade Animal, ao **Carlos Manoel** secretário do PPBC/UFOPA, e a FMVZ/USP nas pessoas da **Prof^a. Angélica Miglino**, ao técnico **Ronaldo**, e aos Dr. **Phelippe Favaron** e **Luciana Guimarães**. Ao **Prof. Moacir Boreli** e a técnica de laboratório **Leila** do Laboratório Celso Matos e a **Raimundo**, técnico do laboratório Amaral Costa.

Agradeço de forma especial a todas as pessoas que nesta caminhada estiveram ao meu lado, me apoiando e motivando para nunca parar.

“Fracassado é aquele que abandona a luta ou nega-se a travá-la. Dificilmente logrará vitória quem se recusa a enfrentar os desafios do cotidiano. Quedas e aparentes insucessos são experiências que, repetidas, favorecem o homem com o êxito que deve perseguir até o fim. Desistir do empreendimento porque se apresenta difícil, significa abandonar-se a contínuos insucessos. Não recear jamais, nem ceder à tentação da desistência na luta de ascensão. Se queres, podes.”

Joanna de Angelis

MARINHO, Daliane Ferreira. **Avaliação da utilização terapêutica da formulação em gel do oleorresina de *Copaifera duckei* Dwyer em uso tópico por fonoforese.** 2015. 104p. Dissertação de Mestrado em Biociências. Programa de Pós Graduação em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2015.

RESUMO

O ultrassom (US) terapêutico é uma das terapias físicas mais utilizadas na Fisioterapia como recurso eletrotermoterapêutico para o controle do processo inflamatório e aceleração do processo de cicatrização tecidual. Dentre as modalidades de aplicação do US terapêutico temos o método de fonoforese. Há muito tempo o OR de copaíba é reconhecido e utilizado por comunidades tradicionais como recurso natural no tratamento de afecções inflamatórias. Este estudo procura estudar a aplicação associada do OR de copaíba em gel com o método de fonoforese, visto que ainda são poucas as pesquisas desenvolvidas nessa temática, e inexistentes em relação à espécie *Copaifera duckei* Dwyer. Assim, esse trabalho teve como objetivo principal avaliar a ação terapêutica de um gel fitoterápico do OR de *C. duckei* administrado através do método de fonoforese sobre a fase inflamatória do processo de reparação muscular. Para isso foi realizada uma pesquisa experimental com a produção de um gel de *C. duckei* a 10% e em seguida sua administração por fonoforese sobre o músculo gastrocnêmio submetido a trauma induzido por mecanismo tipo queda livre, a fim de analisar sua ação sobre a fase inflamatória do processo de recuperação muscular, considerando-se as variáveis de análise histológica, fibrose, necrose, edema, infiltrado inflamatório e células com núcleos centralizados. Análises adicionais quanto à toxicidade aguda e em aplicações de doses repetidas também foram realizadas através da utilização dos protocolos OCDE 404 e OCDE 410, e outras análises quanto ao pH e a transmissibilidade do gel, além do potencial de abertura sobre o estrato córneo da pele também foram realizadas. Os dados relativos a estas análises foram tabulados em planilhas do software *Excell* (Microsoft® - EUA), e posteriormente receberam tratamento estatístico pelo *software* BioEstat 5.3. Para este estudo experimental foi admitido o nível de significância de 0,05 ($\alpha=0,05$ ou 5%), para um erro amostral de 5% em todas as análises. Concluímos que todas as terapias utilizadas mostraram resultados significativos no processo de reparação muscular quando comparadas ao grupo controle.

Palavras-chave: *Copaifera*. Ultrassom. Fonoforese. Músculo esquelético.

MARINHO, Daliane Ferreira. **Avaliação da utilização terapêutica da formulação em gel do oleorresina de *Copaifera duckei* Dwyer em uso tópico por fonoforese.** 2015. 104p. Dissertação de Mestrado em Biociências. Programa de Pós Graduação em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2015.

ABSTRACT

Ultrasound (US) is one of the therapeutic physical therapies commonly used in physical therapy as eletrotermoterapêutico feature to control the inflammatory process and acceleration of tissue healing process. Among the US Therapeutic implementing rules have the phonophoresis method. A long time copaíba OR is recognized and used by traditional communities as a natural resource in the treatment of inflammatory disorders. This study aims to study the associated application of OR copaíba gel with phonophoresis method, since there are few research carried this theme, and nonexistent in relation to the species *Copaifera duckei* Dwyer. Thus, this study aimed to evaluate the therapeutic action of a herbal gel OR *C.duckei* administered through the phonophoresis method on the inflammatory phase of the muscle repair process. For this purpose an experimental study with the production of a gel *C.duckei* 10% and then its administration by phonophoresis on the gastrocnemius muscle subjected to trauma-induced free fall type mechanism was conducted in order to examine its effect on the phase inflammatory muscle recovery process, considering the variables histological analysis, fibrosis, necrosis, edema, and inflammatory infiltrate cells with centralized cores. Further analysis on acute toxicity and repeated dose applications were also performed by using the OECD 404 and OECD 410, protocols and other analysis for pH and the transmissibility of gel in addition to the potential opening of the stratum corneum of the skin as well were realized. The data for this analysis were tabulated in Excell spreadsheet software (Microsoft ® - USA), and later received statistical treatment by BioEstat 5.3 software. For this experimental study was admitted to the 0.05 significance level ($\alpha = 0.05$ or 5%), to a sampling error of 5% for all analyzes. We conclude that all therapies used showed significant results in the muscle repair process when compared to the control group.

Keywords: *Copaifera*. Ultrasound. Phonophoresis. Skeletal muscle.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise qualitativa e quantitativa do óleorresina de <i>C.duckei</i> por cromatografia gasosa de alta resolução. Análise realizada pelo laboratório UFSM/RS.	51
Tabela 2 -	Resultado do teste de transmissibilidade qualitativa do gel de <i>C.duckei</i> 10% com o US nos modos contínuo, pulsado 20% e pulsado 50%, com o sistema baseado no modelo proposto por Guirro <i>et al.</i> (1996).	54
Tabela 3 -	Porcentuais de transmissibilidade em gramas, com média e desvio padrão, encontrados no gel de <i>C.duckei</i> 10% aplicado através do modo contínuo. Baseado no modelo proposto por Guirro <i>et al.</i> (1996).	55
Tabela 4 -	Resultado do teste de transmissibilidade quantitativa (média e desvio padrão) do gel de <i>C.duckei</i> 10% com o US no modo pulsado 20%, sistema baseado no modelo proposto por Guirro <i>et al.</i> (1996).	56
Tabela 5 -	Resultado do teste de transmissibilidade quantitativa (média e desvio padrão) do gel de <i>C.duckei</i> 10% com o US no modo pulsado 50%. Sistema baseado no modelo proposto por Guirro <i>et al.</i> (1996).	58
Tabela 6 -	pH dos géis de <i>C.duckei</i> utilizados na pesquisa, com valores médios e desvio padrão.	60
Tabela 7 -	Valores médios (\pm erro padrão da média) de variáveis sangüíneas e leucograma em fêmeas tratadas de forma tópica por 21 dias com gel fitoterápico de OR de <i>C.duckei</i> nas concentrações de 75%, 50% e 25% (Teste OCDE 410 de doses cumulativas) em comparação com os valores de normalidade estabelecidos pelo analisador hematológico Mindray BC-2800 Vet, para ratos e da literatura, Garcia e Navarro (2005).	66
Tabela 8 -	Valores médios (\pm erro padrão da média) com significância das variáveis sangüíneas e leucograma em fêmeas tratadas de forma tópica por 21 dias com gel fitoterápico de OR de <i>C.duckei</i> nas concentrações de 75%, 50% e 25%.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Árvore de copaíba <i>s.p.</i>	19
Figura 2 -	Método de extração do OR de copaíba.	20
Figura 3 -	Representação das camadas da pele.	23
Figura 4 -	Esquema representativo das vias de penetração do fármaco através do estrato córneo (via transcelular e via intercelular)	23
Figura 5 -	Organização do tecido muscular.	25
Figura 6 -	Aparelho gerador de ondas ultrassônicas (Ultrassom terapêutico) e gel acoplador.	27
Figura 7 -	Representação da utilização do ultrassom através da técnica de fonoforese.	29
Figura 8 -	Componentes da base farmacêutica em gel hidroalcoólico determinada pela Farmacopéia Brasileira, 1ª edição (2011).	34
Figura 9 A -	Recomendação da Farmacopéia Farmacopéia Brasileira (2011) para pomadas contendo OR de diferentes copaíbas.	34
Figura 9 B -	Recomendação da Farmacopéia Farmacopéia Brasileira (2011) para formulação em gel de arnica.	35
Figura 10 -	Figura 10 – pHmetro digital.	36
Figura 11 -	Quadros de classificação do Protocolo OECD/OCDE 404. A) Formação de eritema e escaras; B) Formação de edema. C) <i>Score</i> geral de classificação da substância com base nas médias das avaliações dos examinadores.	38
Figura 12 -	Aparelho de US utilizado.	41
Figura 13 -	Avaliação qualitativa da transmissibilidade das ondas ultrassônicas. A) Com água destilada. B) Com gel de <i>C.duckei</i> a 10%.	42
Figura 14 -	Esquema do equipamento de avaliação quantitativa baseado no modelo proposto por Cameron e Monroe (1992).	44
Figura 15 -	Produção da lesão traumática. A) Mecanismo de produção da lesão traumática adaptado de McBrier (2009). B) Posicionamento do membro posterior esquerdo do animal para a produção do trauma.	47
Figura 16	Avaliação da abertura do estrato córneo. A) Fotografia do corte histológico apresentando a abertura da camada córnea, objetiva de 4x. B) Fotografia do corte histológico com as cinco medidas tomadas da abertura da camada córnea, objetiva de 4x.	49
Figura 17 -	Resultado do teste de transmissibilidade quantitativa do gel de <i>C.duckei</i> 10% com o US no modo contínuo em comparação aos valores obtidos com a água destilada e o gel carbopol. Análise através do sistema baseado no modelo proposto por Guirro <i>et al.</i> (1996).	56
Figura 18 -	formação de uma linha de transmissão das ondas de US entre o cabeçote e o cone no teste com água destilada no modo pulsado 20% e 50%.	57
Figura 19 -	Resultado porcentual em relação ao gel carbopol da transmissibilidade quantitativa do gel de <i>C.duckei</i> 10% com o US no modo pulsado 50%. Análise através do sistema baseado no modelo proposto por Guirro <i>et al.</i> (1996).	58
Figura 20 -	Resultados da avaliação com média e desvio padrão, quanto à capacidade de abertura do estrato córneo da pele do gel de <i>C.duckei</i> 10% em comparação com outros grupos de tratamento.	61
Figura 21 -	Avaliação da irritação/corrosão dérmica (com média e desvio padrão) conforme	64

	critérios do protocolo OCDE 404 adaptado para o protocolo OCDE 410 (comparação dos resultados obtidos com grupo controle em relação aos resultados dos grupos com gel de OR nas concentrações de 75%, 50% e 25%).	
Figura 22 -	Peso médio (em gramas) mais desvio padrão dos órgãos extraídos na autópsia conforme protocolo OCDE 410 após 21 dias de aplicações tópicas de gel com OR de <i>C. duckei</i> nas concentrações de 75%, 50% e 25%.	66
Figura 23 -	Área de formação de fibrose (em μm) nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7 ^o dia). Os resultados estão expressos em média, n=5/grupo.	69
Figura 24 -	Área de edema (em μm) nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7 ^o dia). Os resultados estão expressos em média, n=5/grupo.	70
Figura 25 -	Área de necrose (em μm) nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7 ^o dia). Os resultados estão expressos em média, n=5/grupo.	71
Figura 26 -	Número de células/campo de células do infiltrado inflamatório nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7 ^o dia). Os resultados estão expressos em média, n=5/grupo.	72
Figura 27 -	Número de células/campo de células com núcleos centralizados nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7 ^o dia). Os resultados estão expressos em média, n=5/grupo.	73
Figura 28 -	Quadro comparativo entre os diferentes grupos de tratamento quanto ao <i>ranking</i> de melhores resultados encontrado de acordo com os dias de tratamento para as variáveis estudadas. (C) Grupo controle; (T) Grupo tópico; (F) Grupo fonoforese; (US) Grupo ultrassom.	74
Figura 29 -	Histologia do grupo controle 48h. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■); necrose (►) e fibrose (↓). Aumento de 4x.	77
Figura 30 -	Histologia do grupo controle 7 ^o dia. Apresentando infiltrado inflamatório (●); núcleos centralizados (*). Aumento de 10x.	77
Figura 31 -	Histologia do grupo US 48h. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■) e fibrose (↓). Aumento de 4x.	78
Figura 32 -	Histologia do grupo US 7 ^o dia. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■); necrose (►) e fibrose (↓). Aumento de 4x.	78
Figura 33 -	Histologia do grupo tópico 48h. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■); necrose (►) e fibrose (↓). Aumento de 4x.	79
Figura 34 -	Histologia do grupo tópico 7 ^o dia. Apresentando infiltrado inflamatório (●); núcleos centralizados (*) e fibrose (↓). Aumento de 4x.	79
Figura 35 -	Histologia do grupo fonoforese 48h. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■); necrose (►) e fibrose (↓). Aumento de 4x.	80
Figura 36 -	Histologia do grupo fonoforese 7 ^o dia. Apresentando infiltrado inflamatório (●); necrose (►) e fibrose (↓). Aumento de 4x.	80
Figura 37 -	Histologia do grupo controle 7 ^o dia. Apresentando núcleos centralizados (*). Aumento de 10x.	81
Figura 38 -	Histologia do grupo US 7 ^o dia. Apresentando núcleos centralizados (*). Aumento de 40x.	81
Figura 39 -	Histologia do grupo tópico 7 ^o dia. Apresentando núcleos centralizados (*). Aumento de 40x.	82
Figura 40 -	Histologia do grupo Fonoforese 7 ^o dia. Apresentando núcleos centralizados (*). Aumento de 40x.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C. duckei – *Copaifera duckei*.

CEUA – Comissão de ética em uso de animais.

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

FLONA – Floresta Nacional do Tapajós.

HCT – Hematócrito

HE – Hematoxilina-eosina

HGB – Hemoglobina

ICMBio – Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade.

m – metro

MHz – Mega Hertz

mm. - Músculo

OCDE – Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico.

OMS – Organização Mundial de Saúde

PLT – Plaquetas

PVC – Policloreto de vinila

RBC – Eritrócito

OR – Óleo-resina.

pH – Potencial hidrogênio iônico.

PPBC – Programa de pós-graduação em Biociências.

PROPPIT – Pró-reitoria de pesquisa, pós-graduação, iniciação científica e tecnológica.

SISBIO – Sistema de autorização e informação em biodiversidade.

UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará.

UFSM/RS – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

US – Ultrassom.

WBC – Leucócito total.

W/cm² – Watts por centímetro quadrado.

µm – micrômetro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	08
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	16
2.2 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS COM PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	17
2.3 GÊNERO COPAÍBA E ESPÉCIE <i>C. duckei</i> DWYER	18
2.4 DERMATOTOXICIDADE	22
2.5 LESÕES MUSCULARES DE ORIGEM TRAUMÁTICA	25
2.6 O ULTRASSOM (US) NO TRATAMENTO DE LESÕES MUSCULARES	27
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 PRINCÍPIOS ÉTICOS DA PESQUISA	32
4.2 TIPO DE ESTUDO	32
4.3 LOCAL E PERÍODO	33
4.4 AMOSTRA	33
4.5 MATERIAL BOTÂNICO E FORMULAÇÃO EM GEL 10%	33
4.6 DETERMINAÇÃO DO pH	35
4.7 ANÁLISE DA TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA	36
4.8 ANÁLISE DA TOXICIDADE DÉRMICA APÓS DOSES CUMULATIVAS	39
4.9 APARELHO DE US E PARÂMETROS UTILIZADOS	40
4.10 AVALIAÇÃO DA TRANSMISSIBILIDADE DAS ONDAS ULTRASSÔNICAS	41
4.11 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA PELE	44
4.12 TÉCNICA DE INDUÇÃO ANESTÉSICA E EPILAÇÃO	46
4.13 PRODUÇÃO DA LESÃO TRAUMÁTICA	46
4.14 AÇÃO TERAPÊUTICA DO GEL DE <i>C. duckei</i> 10%	47
4.15 ANÁLISE DOS RESULTADOS	50

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO OR <i>C. duckei</i>	51
5.2 AVALIAÇÃO DA TRANSMISSIBILIDADE DAS ONDAS ULTRASSÔNICAS	53
5.2.1 Avaliação Qualitativa	53
5.2.2 Avaliação Quantitativa	54
5.3 DETERMINAÇÃO DO pH DO OR E DO GEL DE OR DE <i>C. duckei</i>	60
5.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA PELE	61
5.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA PELO PROTOCOLO OCDE 404	63
5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA CUMULATIVA PELO PROTOCOLO OCDE 410	65
5.6.1 Exame dos órgãos internos e peso médio de fígado e rins	65
5.6.2 Análise de parâmetros hematológicos	66
5.7 AÇÃO TERAPÊUTICA DO GEL DE <i>C. duckei</i> 10%	68
6 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

Dentre as patologias tratadas pelas ciências da reabilitação, as que desencadeiam quadros inflamatórios em decorrência de lesões musculares traumáticas estão entre as mais recorrentes, o que aumenta a importância de se descobrirem novas e eficientes terapias antiinflamatórias e de reparação tecidual, principalmente as que minimizassem os efeitos colaterais dos fármacos atualmente utilizados. Destacam-se nesse sentido as pesquisas que visam o emprego de substâncias naturais, dentre elas as que exploraram o efeito antiinflamatório e cicatrizante do oleoresina (OR) de copaíba *s.p.* (BRITO *et al.*, 2001; MUNIZ, 2009; MONTES *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2006; BOTELHO *et al.*, 2011; GIESBRECHT, 2011).

Ha muito tempo o OR de copaíba é reconhecido e utilizado por comunidades tradicionais como recurso natural no tratamento de afecções inflamatórias e no processo de cicatrização, dentre outras aplicações. Sendo que muitos de seus efeitos, como o efeito antiinflamatório e cicatrizante, já possuem comprovações científicas (PIERI, MUSSI, MOREIRA, 2009).

O ultrassom (US) terapêutico é uma das terapias físicas mais utilizadas na Fisioterapia como recurso eletrotermoterapêutico para o controle do processo inflamatório e aceleração do processo de cicatrização tecidual. Dentre as diversas modalidades de aplicação do US terapêutico temos o método de fonoforese, que consiste na aplicação transdérmica de fármacos através das ondas mecânicas produzidas pelo equipamento de US, a fim de combinar os efeitos de ambas as terapias e minimizar os efeitos colaterais destes fármacos no sistema gástrico (ROSIM, 2003; ALFREDO, 2008; ENGELMANN, 2010; GURNEY, 2011; OLIVEIRA, PIRES e SOARES, 2011; VICTOR *et al.*, 2012).

No entanto, quando falamos da aplicação associada do OR de copaíba com o método de fonoforese ainda são poucas as pesquisas desenvolvidas, e inexistentes em relação à espécie *Copaifera duckei* Dwyer (*C. duckei*). Dentre as realizadas com copaíba em geral temos a de Brito *et al.* (2001); Cabral, Fiorini, Carvalho (2006); Muniz (2009) e Montes *et al.* (2009).

Com esta pesquisa pretende-se ingressar no campo de discussões em torno da viabilidade técnica e terapêutica da utilização do OR de *C. duckei* em sua formulação em gel, através da sua administração por fonoforese no tratamento do processo inflamatório agudo de uma lesão muscular de origem traumática.

Ainda pretende subsidiar dados para o desenvolvimento de uma nova forma de aplicação terapêutica do OR de copaíba e de um novo produto fitoterápico em gel para ser utilizado de forma tópica associada ou não a fonoforese, no tratamento da fase inflamatória de lesões musculares de origem traumática.

Esta pesquisa vem se propôr a esclarecer a questão da dimensão do efeito terapêutico de uma formulação em gel a 10% de *C.duckei* sobre a fase inflamatória do processo de recuperação de lesões musculares de origem traumática, responder sobre a viabilidade técnica dessa formulação e ainda analisar a toxicidade dérmica do OR de copaíba aplicado tanto por via tópica como por fonoforese.

O estudo também procura encontrar evidências para os relatos do fato de que esse fármaco natural quando aplicado através da terapia de fonoforese mantém o seu efeito terapêutico ou o potencializa através de tal associação. Isso por meio de uma análise realizada durante a fase inflamatória do processo de reparação de uma lesão muscular traumática.

Pelos motivos expostos a realização desta pesquisa apresenta-se como um importante instrumento para o desenvolvimento científico em torno da viabilidade técnica, da toxicidade dérmica e dos efeitos terapêuticos do óleorresina de copaíba *C.duckei* em sua formulação em gel a 10% quando utilizado com a finalidade de tratamento de lesões musculares de origem traumática associada ou não ao método de fonoforese.

A viabilidade técnica do produto representaria um benefício maior para a comunidade em geral, uma vez que aumentaria o arsenal terapêutico conhecido disponível por proporcionar evidências da segurança da administração do OR de copaíba no tratamento da fase inflamatória de disfunções musculares de etiologia traumática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

A manutenção de crença popular brasileira forte em curandeiros e benzedeadas, principalmente nas regiões mais longínquas de centros urbanos e, sobretudo na região amazônica, ocorrida com a transmissão verbal desse costume, conservou e manteve forte o uso de plantas medicinais no nosso país. Sendo que essas profundas raízes culturais da população brasileira facilitaram a sobrevivência da Fitoterapia até os dias atuais. Visto que a consciência popular reconhece a eficácia e legitimidade desta modalidade terapêutica (SACRAMENTO, 2000; SANTOS *et al.*, 1995).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) constatou que tais práticas não convencionais de saúde estão ganhando espaço de modo a complementar as terapias medicamentosas alopáticas. Sendo que além do fator custo, outro ponto positivo atribuído pela população é que esta considera que as plantas medicinais são menos agressivas ao organismo (OMS, 2008).

O Brasil é visto em destaque nesse campo por possuir um terço da flora mundial. Sendo a Amazônia considerada a maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica do planeta. O que a torna um grande laboratório a céu aberto, promissor na descoberta de novos medicamentos fitoterápicos (YUNES *et al.*, 2001; FRANÇA *et al.*, 2008).

Dentre as técnicas terapêuticas classificadas dentro da medicina integrativa, a fitoterapia vem sendo a que mais cresceu nos últimos anos. Atualmente, os fitoterápicos são amplamente utilizados em diversos países, principalmente nos mais pobres, frente ao alto custo dos fármacos sintéticos. O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos é de US\$ 43 bilhões por ano. Estima-se ainda que cerca de 60% dos fármacos com atividades antitumorais e antimicrobianas, já comercializados ou em fase de pesquisa clínica, sejam de origem natural (ASCHWANDEN, 2001; SHU, 1998).

Em geral, fitoterapia é confundida com o uso de plantas medicinais. No entanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera “como medicamento fitoterápico aquele obtido exclusivamente de matérias-primas de origem vegetal, com qualidade constante e reprodutível e que tantos os riscos quanto à eficácia sejam caracterizadas por levantamentos etnofarmacológicos, documentações técnico científicas em publicações ou ensaios clínicos (NICOLETTI *et al.*, 2007; BRASIL, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 1978 tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais. No Brasil, o interesse está no sentido de fortalecer a fitoterapia no Sistema único de Saúde (SUS), através da Portaria N° 971/2006 que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS (BRASIL, 2006; SANTOS *et. al.*, 2011).

No âmbito da Fisioterapia, o Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional regulamentou o uso pelos fisioterapeutas das práticas integrativas e complementares de saúde nos termos da referida portaria do Ministério da Saúde (MS) através da Resolução COFFITO n°. 380/2010 (COFFITO, 2010).

2.2 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS COM PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

O uso de plantas com finalidade terapêutica são reconhecidos a séculos. No entanto, a partir do desenvolvimento da indústria farmacêutica e da descoberta de técnicas de isolamentos de substâncias, estas acabaram por substituir o uso de extratos vegetais. Assim, o que se viu foi uma crescente produção de fármacos via síntese química que impulsionaram a substituição destes, aliando a isso o crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas e a ausência de comprovações científicas de eficácia das substâncias de origem vegetal sem esquecer ainda das dificuldades de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais até então utilizados (RATES, 2001).

A partir de 1980, com o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais ressurgiu o interesse pela pesquisa destas substâncias, como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Isso consolidou as plantas medicinais no cenário dos tratamentos alternativos em vários países do mundo. Nas últimas décadas se observou a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas e a sua produção em escala industrial (TUROLLA E NASCIMENTO, 2006).

As plantas medicinais desempenham papel muito importante na medicina moderna. Elas podem fornecer fármacos extremamente importantes que dificilmente seriam obtidos via síntese química, por serem fontes naturais de compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos, além disso, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1996).

Cresceu também a preocupação das autoridades regulatórias com a normatização dos medicamentos fitoterápicos, a fim de garantir a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. Uma vez que, por vezes, o uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado apenas em conhecimentos populares, aliados à crença de que não causaria reações adversas por ser natural fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança (TUROLLA E NASCIMENTO, 2006).

No entanto, o consumo de plantas de modo indiscriminado representa um risco para a saúde humana, pois em geral não há respeito aos limites de uso dos fitoterápicos. Geralmente não há informações sobre efeitos colaterais. Assim, estudos multidisciplinares, associando fitoquímicos e farmacólogos são cada vez mais importantes para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (MACIEL *et al.*, 2002).

2.3 GÊNERO COPAÍBA E ESPÉCIE *Copaifera duckei* Dwyer

As copaibeiras são árvores comuns à América Latina e África Ocidental. No Brasil podemos encontrá-las nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica. Tais plantas chegam a viver cerca de 400 anos e atingir uma altura entre 25 e 40 metros (Figura 1) (ARAÚJO JÚNIOR *et al.*, 2005).

Sua classificação botânica a descreve como: pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae*, gênero *Copaifera*. Possui 72 espécies descritas, sendo 16 delas encontradas exclusivamente no Brasil (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Da árvore da copaíba é extraído um óleo-resina, de cor que varia de amarelo ouro a marrom dependendo da espécie. Esse óleo resina tem sido utilizado desde a época da chegada dos portugueses ao Brasil na medicina tradicional popular e para diversas finalidades. Hoje se encontra como um dos mais importantes produtos naturais amazônicos comercializados, inclusive para outros países (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).



Figura 1 - Árvore de copaiba *s.p.*
Foto: Inaê Ferreira

O óleo-resina é obtido através da perfuração no tronco da copaibeira (Figura 2) (OLIVEIRA *et al.*, 2005). É uma substância natural composta de uma parte sólida, resinosa não volátil formada por ácidos diterpênicos responsável por 55 a 60 % do óleo, a parte sólida é utilizada como bálsamo. Diluída na outra parte temos um óleo essencial composto de sesquiterpenos e estes podem ser divididos em sesquiterpenos oxigenados (alcoóis) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos que possuem maior atividade antiinflamatória quando comparados aos outros grupos presentes (RAMOS, 2006).

O óleo extraído pode variar em relação à concentração e natureza dos diterpenos e sesquiterpenos presentes de acordo com variações de espécies, fatores biológicos como insetos e fungos, ou fatores abióticos. Alguns estudos com o uso da *C. duckei* não apresentaram diferença significativa na composição de óleos extraídos das mesmas árvores em épocas sazonais diferentes (RIGAMONTE AZEVEDO *et al.*, 2006).

No que se refere à composição química dos óleo-resinas das espécies de *Copaifera*, observa-se a predominância de sesquiterpenos, como o α -humuleno, α e β -selineno, β -bisaboleno e β -cariofileno (LANGENHEIM; FEIBERT, 1988; PINTO *et al.*, 2000). O β -bisaboleno possui propriedades antiinflamatórias e analgésicas e o β -cariofileno é descrito na

literatura como anti-edêmico, antiinflamatório, bactericida e insetífugo (VEIGA JR.; PINTO, 2002).

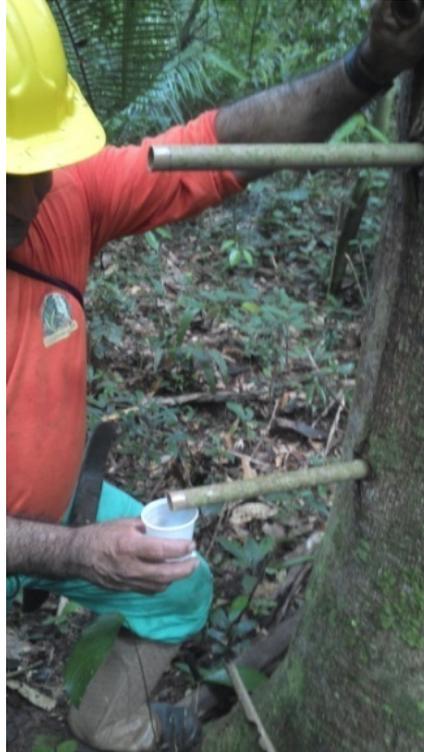


Figura 2 - Método de extração do OR de copaíba.
Foto: João Oliveira.

Segundo Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006), “a espécie *C. duckei* produz um óleo de aspecto líquido, viscoso, de odor forte e de coloração vermelho intenso. Esses tipos de óleo são geralmente empregados, na medicina caseira, indústria farmacêutica e cosmética.”

A espécie *C. duckei* é mais comum na região nordeste do estado do Pará e oeste do Maranhão (MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2007). Em pesquisa realizada na região do município de Mojú - PA, as maiores produções do óleo da espécie *C. duckei* ocorreram nos meses de setembro a novembro, o que coincidiu com o período de menor precipitação pluviométrica. Enquanto a menor produção deste óleo ocorreu no período de janeiro a maio, coincidindo com o período chuvoso. Sendo que na *C. duckei* a concentração do sesquiterpeno β -bisaboleno foi superior a do β -cariofileno em todos os meses do ano, ocorreram ainda variações nos percentuais das substâncias independentes do período de chuvas (OLIVEIRA, LAMEIRA e ZOGHBI, 2006).

O óleoresina extraído da copaibeira recebe indicação da medicina tradicional, para inúmeras finalidades, das mais diferentes naturezas, e tem sido há vários anos matéria de estudos, visando comprová-los ou adaptá-los a novas terapias. As principais propriedades terapêuticas citadas são a atividade antiinflamatória, que tem como principais componentes responsáveis os hidrocarbonetos sesquiterpênicos; ação cicatrizante; potencial anti-séptico; antitumoral; antibacteriano; germicida; expectorante e analgésico (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; GURGEL, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PACHECO *et al.*, 2006).

Leandro *et. al.* (2012) relatam que a *C. duckei* possui cinco efeitos comumente testados, o antimicrobiano, antimutagênico, embriotóxico, anti-inflamatório e analgésico, além de anti-edematogênico, tóxico e fetotóxico. Este descreveu ainda a composição química do óleoresina de copaíba, onde para espécies de *C. duckei* foram encontrados 35 sesquiterpenos dos 38 identificados no gênero. Quanto aos diterpenos estes foram enumerados em cinco com três derivados.

Na última década podemos citar poucos trabalhos que utilizaram a espécie *C. duckei* como instrumento de estudo. Todos esses trabalhos forma realizados de forma experimental, sendo que em muitos casos através de pesquisas comparativas entre efeitos de espécies diferentes, principalmente com a espécie *C. reticulata*. Que pelo que foi observado durante as buscas, dentre todas as espécies de copaíba foi a mais utilizada em diversos experimentos. Os efeitos da *C. duckei* pesquisados nesses períodos foram analisados com base no óleo da planta e na análise de seus substratos, e em sua maioria foi o óleo o instrumento de estudo mais utilizado. Entre os efeitos pesquisados temos: a ação antipatógena, a atividade alelopática, os efeitos toxicológicos, embriotóxicos e mutagênicos, além de pesquisas quanto à produção sazonal do óleo e a descrição da anatomia da planta e do seu perfil químico (MAISTRO *et. al.*, 2005; OLIVEIRA, LAMEIRA e ZOGHBI, 2005; CABRAL, FIORINI e CARVALHO, 2006; LAMEIRA *et. al.*, 2006; OLIVEIRA *et. al.*, 2006; ORELLANA E KOBAYASHI, 2006; LIMA e PIO, 2007; MARTINS-DA-SILVA, PEREIRA e LIMA, 2007; GURGEL, 2009; LIMA, 2009; MUNIZ, 2009; PIERI, MUSSI e MOREIRA, 2009; SOUSA FILHO *et. al.*, 2010; BATISTA *et. al.*, 2011; LIMA *et. al.*, 2011; ALMEIDA *et. al.*, 2012; HECK, VIANA E VICENTINI, 2012; LEANDRO *et. al.*, 2012; MEDEIROS *et. al.*, 2012; DORNELES *et. al.*, 2013).

2.4 DERMATOTOXICIDADE

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e exerce tanto a função de proteção como de comunicação com o meio externo. Atua na proteção contra agentes externos, controle de temperatura, defesa orgânica, sensorial, estética, absorção e eliminação de agentes químicos, absorção de radiação ultravioleta, síntese de vitamina D, excreção glandular, regulação hemodinâmica e, expressão dos sentimentos e emoções (rubor, palidez, erexão de pêlos, sudorese) (RIBEIRO, 2010).

Segundo POHLMANN (2008) a pele é constituída por três camadas distintas (Figura 3):

Epiderme: camada mais externa, formada por queratinócitos que são produzidos na camada mais inferior da epiderme (camada basal) que evoluem em direção a superfície sofrendo um processo de queratinização dando origem a camada córnea ou estrato córneo, composta pela queratina que é uma proteína responsável pela impermeabilização da pele. O estrato córneo é constantemente renovado através de um processo de produção e eliminação celular. Estão também nessa camada os melanócitos, células de defesa e células sensoriais e dela se originam os anexos cutâneos. Devido à organização estrutural e a hidrofobicidade, o estrato córneo atua como a principal barreira de penetração de substâncias topicamente bem como reservatório para formulações aplicadas por essa via. Essas ações são importantes para a escolha de medicamentos que visam ações apenas tópicas.

Derme: Localizada entre a epiderme e a derme. Tem por função proporcionar resistência e elasticidade a pele frente a agressões e fornecer nutriente a epiderme. É dividida em duas camadas: derme papilar e reticular. Constituída por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos e terminações nervosas. É a principal via para medicamentos que buscam ação sistêmica, devido à presença de vasos sanguíneos.

Hipoderme: é a parte mais profunda da pele, também chamada de panículos adiposos ou tecido celular subcutâneo. É formada por feixes de tecido conjuntivo que envolve células de gordura. Tem função de reservatório de calorías, e proteção do organismo contra traumas mecânicos, além de agir como isolante térmico.

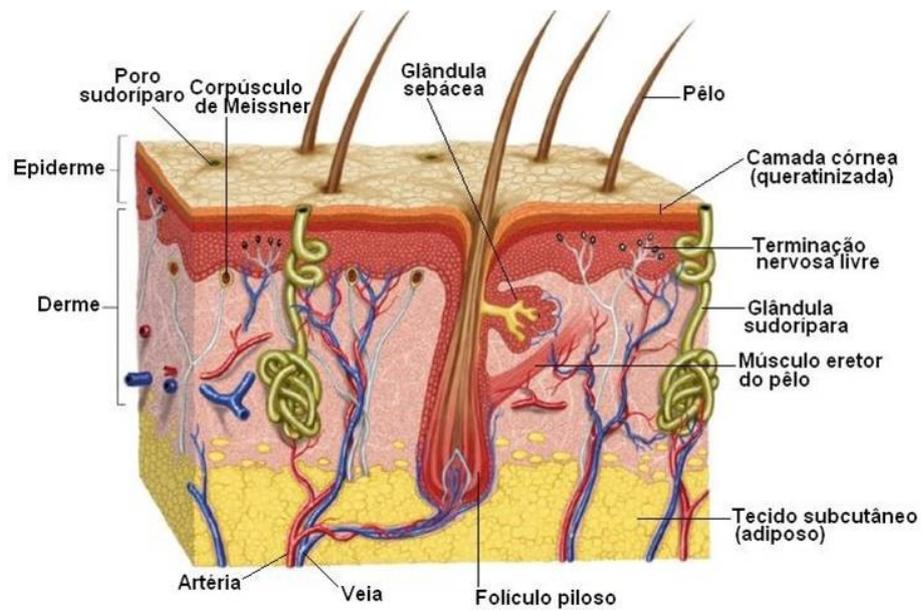


Figura 3 – Representação das camadas da pele.
 Fonte: Site Anatomia e fisiologia humana (2014).
<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>

O estrato córneo é o regulador primário de penetração de substâncias na pele. Um fármaco pode atravessar o estrato córneo através de duas vias: a via intercelular e a via transcelular. Outra rota considerada é a paralela, onde a substância penetra através dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas e das glândulas sudoríparas (Figura 4) (KARAN, 2009).

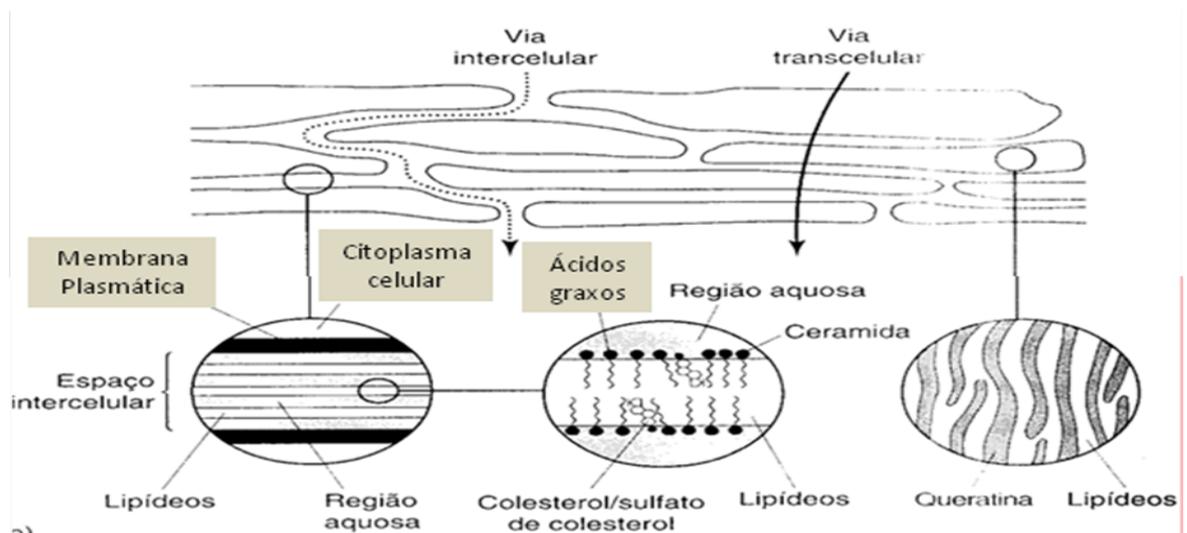


Figura 4 – Esquema representativo das vias de penetração do fármaco através do estrato córneo (via transcelular e via intercelular)
 Fonte: MARTINS; VEIGA (2002)

As reações de hipersensibilidade ou alergia são mecanismos de reação da pele em que reconhece as substâncias potencialmente lesivas. Gell e Coombs *apud* Parham (2001) propuseram uma classificação dividindo em quatro as reações imunológicas:

Reação tipo I (Reagínico anafilática): Resulta da ligação do antígeno à IgE específica para o antígeno, através de sua fração Fc e fixa-se as células através de receptores de alta afinidade, como os mastócitos nos tecidos e basófilos no sangue.

Reação tipo II ou citotóxica: Mediada por anticorpos do tipo IgM e IgG e reagem a antígenos ligados a superfície celular (fármacos) ou a componentes naturais do próprio organismo.

Reação tipo III (*mediada por imunocomplexos*): Nesta reação os antígenos livres ao interagirem com anticorpos circulantes (IgG), formam imunocomplexos que se precipitam na luz dos vasos e espaços tissulares.

Reação do tipo IV (*imunidade mediada por células*): é a reação dependente das células T, não havendo participação de anticorpos.

Segundo a ANVISA (2003), dentro das manifestações clínicas da dermatotoxicidade temos:

Dermatite de contato: definida como uma inflamação cutânea resultante da interação de um agente externo e a pele.

Irritação dérmica: Definida como a produção de danos reversíveis na pele após a aplicação de uma substância teste por até quatro horas.

Irritação cutânea após exposição repetida: substâncias que podem causar ressecamento da pele, descamação ou fissurações cutâneas após exposição repetida, mas que não pode ser considerada um irritante da pele e enquadra-se nessa categoria.

Corrosão dérmica: Definida como a produção de danos irreversíveis a pele após aplicação de uma substância teste por até quatro horas. Sendo elas úlceras, hemorragias ou escaras sanguinolentas que após 14 dias evoluem com áreas de descoloração, alopecia ou cicatrizes.

Os testes utilizados para estudo da toxicidade de produtos utilizados sobre a pele envolvem testes de irritação da pele, corrosão e alergia. Sendo que dentre eles podemos citar os ensaios toxicológicos específicos *in vitro* e *in vivo* e animais ou humanos, os métodos de Draize para ensaios de toxicidade dérmica e ocular, entre outros, tais como: teste de

comedogenicidade, teste de irritação dérmica primária e cumulativa, fotoalergenicidade, fototoxicidade, HET-CAM e teste de corrosividade (ANVISA, 2010).

2.5 LESÕES MUSCULARES DE ORIGEM TRAUMÁTICA

O sistema músculo-esquelético é responsável pela sustentação e movimentação do corpo devido a sua capacidade de contração e geração da força necessária, que aplicada sobre ossos e articulações, leva a produção dos movimentos corporais para realização das atividades da vida diária. Do ponto de vista estrutural, o músculo esquelético é formado por células cilíndricas alongadas com estrias transversais e núcleos situados na periferia da fibra, em contato com o sarcolema. Cada fibra muscular é revestida por uma camada de tecido conjuntivo chamado endomísio. As fibras são então agrupadas em feixes envolvidos por outra camada de tecido conjuntivo chamado perimísio e o grupo de feixes de fibras são denominados fascículos e recobertos por outra camada de tecido conjuntivo denominado epimísio (Figura 5) (MESQUITA, 2007).

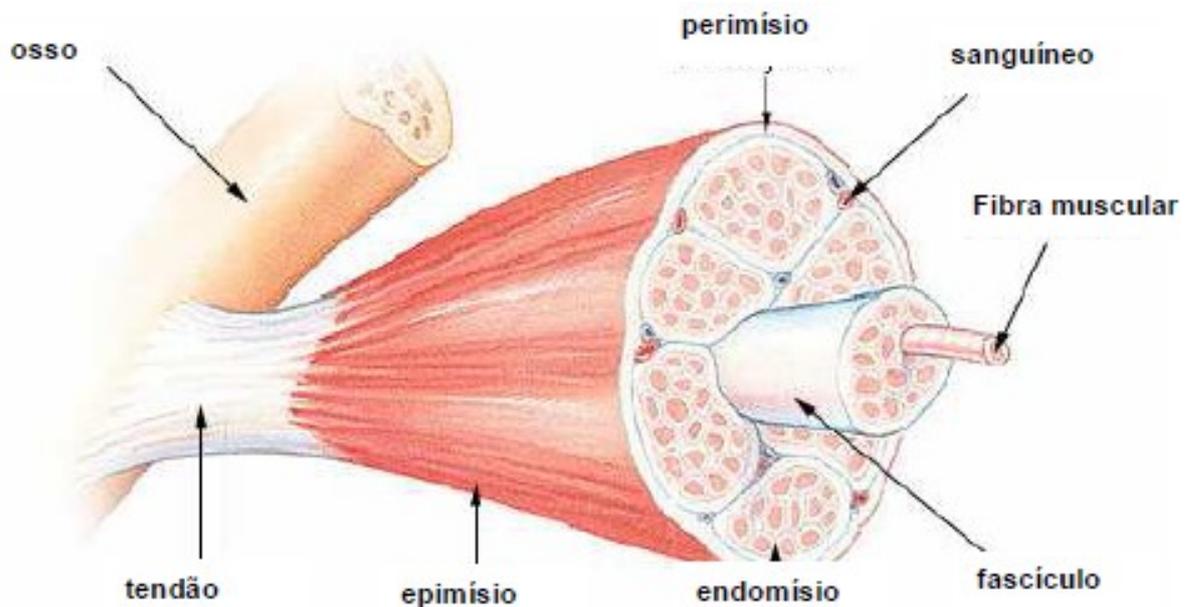


Figura 5 – Organização do tecido muscular.
Fonte: MESQUITA (2007)

A lesão no tecido muscular leva a alterações da funcionalidade do sistema e ocorre devido a mecanismos diversos, dentre eles forças diretas, como lacerações e contusões no músculo, e forças indiretas relacionadas à tensão exercida sobre o músculo. Porém, o processo de reparo é geralmente similar. A lesão músculo-esquelética tem uma regeneração rápida formando miotubos em cerca de três dias, as fibras musculares são reinervadas em 4 a 5 dias e o reparo total ocorre após 21 a 28 dias (TOMASONI, 2011; PIOVESAN, 2012).

Danos musculares traumáticos podem resultar em profundas alterações histopatológicas e perda transitória da função muscular que pode vir a ser definitiva após duas semanas ou mais, dependendo da amplitude da lesão (RIBEIRO, 2009).

O processo de regeneração após a lesão pode ser dividido em três fases: 1) Fase inflamatória aguda ou de destruição (0-7 dias): consiste de tecido edemaciado, formação de hematoma, exsudato de fibrina e infiltrado de células inflamatórias; 2) Fase proliferativa (7-21 dias): ocorre a fagocitose do tecido necrosado, coagulação de fibrina, proliferação de fibroblastos e miofibroblastos, além de crescimento sinovial e capilar; 3) Fase de maturação e remodelamento (21 dias ou mais): consiste de maturação das miofibras, o volume de capilares diminui gradualmente, as fibras de colágeno tipo I começam a se organizar e finalmente ocorre a restauração da capacidade funcional do músculo reparado (JARVINEN *et al.*, 2000; KANNUS *et al.*, 2003).

No processo lesão/cicatrização, o papel da inflamação é marcante, pois é um evento celular inicial, caracterizada pela migração de células polimorfonucleares, pela formação de coágulo e atividade de substâncias biologicamente ativas como prostaglandinas, serotoninas e fator de crescimento derivado das plaquetas (ALVES, 2012).

No período de liberação de histamina ocorre o aumento da permeabilidade dos capilares o que ocasiona edema na região lesada. Os neutrófilos têm a função de eliminar as partículas estranhas do local lesado, os macrófagos fagocitam os fragmentos do tecido lesionado e induzem a ativação das células precursoras das células musculares na reparação, chamadas de células satélites, através da indução e regulação dos fatores de crescimento (MARQUES, 2012).

Após uma lesão, ocorre um rápido influxo de cálcio na fibra muscular que promove uma hipercontração imediata acompanhada pelo acúmulo de uma massa densa e irregular de miofilamentos e pelo desenvolvimento de necrose. Essa necrose do tecido lesado é o estímulo para o início do processo regenerativo. Os macrófagos têm como função a produção e

regulação de fatores de crescimento, como fator de crescimento insulínico (IGF), hepatócito (HGF), fibroblástico (b-FGF) e de transformação (TGF). Estes fatores de crescimento são pequenos peptídeos que regulam a população de células satélites, proliferação, diferenciação e motilidade delas e são responsáveis por moverem as células do estado quiescente para a fase ativa, levando a reparação do tecido muscular lesionado (FERRARI *et al.*, 2005; NOGUEIRA, 2006; TAVARES *et al.*, 2008).

A lâmina basal também é importante no sucesso da regeneração muscular, para a formação e orientação espacial dos novos miotubos e desenvolvimento mínimo de fibrose. Apesar disso, sabe-se que ocorre o processo de regeneração mesmo em situações em que a lâmina basal está gravemente rompida. Sendo que o tempo de regeneração é diferenciado, quando ela se mantém intacta, a regeneração completa pode ocorrer em 7 dias, e quando a destruição é extensa, o processo pode alcançar até 21 dias (FERRARI *et al.*, 2005).

2.6 O ULTRASSOM (US) NO TRATAMENTO DE LESÕES MUSCULARES

O som consiste em vibrações mecânicas num meio elástico. Quando a frequência está acima de 20.000Hz essas vibrações classificam-se como ultrassônicas. No campo da Fisioterapia denomina-se ultrassom (US) as oscilações (ondas) cinéticas ou mecânicas produzidas por um transdutor vibratório que se aplica sobre a pele com fins terapêuticos, atravessando e penetrando no organismo em diferentes profundidades (Figura 6). Exerce sobre o organismo efeitos mecânicos e térmicos (CHAN *et al.*, 2010; ENGELMANN, 2010).

Necessita ainda da utilização de um meio de acoplamento a fim de reduzir a dispersão do feixe sônico, sendo que o meio amplamente utilizado e comercializado é o gel (Polímero Carboxivinílico, Imidazolidil uréia, Metil parabeno, 2 amino, 2 metil, 1 propanol e Água deionizada) (RMC - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE PRODUTOS MÉDICOS, 2013).



Figura 6 – Aparelho gerador de ondas ultrassônicas (Ultrassom terapêutico) e gel acoplador.

Fonte: Site Akwavita (2014)
<http://www.akwavita.com.br>

A substância a servir como meio de acoplamento têm que ser boa condutora de ondas ultrassônicas e, facilitar o deslizamento do transdutor, não pode coagular, ressecar ou formar bolhas; não pode ser irritante a pele e deve possuir baixo custo (AGNE, 2009; KOEKE, 2005).

Os efeitos mecânicos e térmicos do ultrassom produzem como efeitos biológicos a vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo; o aumento da permeabilidade celular e a micro-massagem; o incremento do metabolismo local, com estimulação das funções celulares e da capacidade de regeneração celular; incremento da flexibilidade dos tecidos ricos em colágeno, com diminuição da rigidez articular e da contratura, e efeito analgésico e espasmolítico (KOEKE, 2009).

No modo pulsado predomina os efeitos não-térmicos, isso devido a sua capacidade de reduzir a média temporal de intensidade das ondas. Ao mesmo tempo, assegura que a energia disponível seja alta em cada pulso sem provocar a ocorrência dos efeitos térmicos, com o aquecimento (LOW; REED, 2003).

Os parâmetros dos aparelhos de ultrassom são o modo contínuo ou pulsado, a frequência de 1 ou 3 MHz, a área do cabeçote e a intensidade de aplicação em W/cm^2 . O US terapêutico pode ser aplicado através do método de contato direto sobre a pele da área a ser tratada. Este pode ser ainda subdividido em método subaquático e de acoplamento misto (com balão de látex), método paravertebral reflexo e o método de fonoforese (CAMARGO, 2006).

O método de fonoforese é também conhecido como sonoforese ou ultrafonorese. Este consiste em uma forma ou sistema especial de acoplamento direto que realiza o transporte transdérmico através do ultrassom para facilitar a penetração dos medicamentos aplicados topicamente. O US aumenta a penetração transcutânea por pressão somática, podendo chegar a atingir entre 4-5cm de profundidade (Figura 7) (ORELLANA e KOBAYASHI, 2006).

Os medicamentos recomendados são aqueles na forma de gel, e os mais utilizados são os anestésicos como a lidocaína, substâncias como o mentol para o alívio da dor e antiinflamatórios não esteróides como os salicilatos ou esteróides, como a hidrocortisona e dexametasona (AGNE, 2009; MEIDAN, 1998).

Algumas questões quanto ao processo de regeneração do músculo esquelético permanecem obscuras, como os efeitos de vários tratamentos comumente utilizados para estimular o processo de regeneração muscular. Neste sentido, um dos tratamentos amplamente utilizado é o uso de ultrassom pulsado. Como recurso terapêutico na redução dos sintomas da

inflamação, como dor e edema, e também com o objetivo de aumentar a velocidade de cicatrização (CERUTTI, 2009; POLAT, 2011).

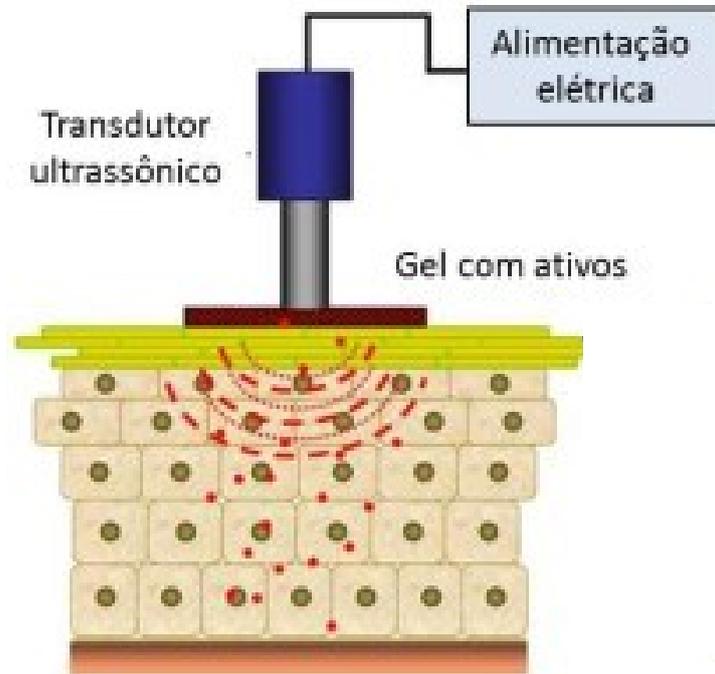


Imagem 7 – Representação da utilização do ultrassom através da técnica de fonoforese.

Fonte: *Site Negócio Estética* (2014)

<http://www.negocioestetica.com.br/tag/sonoforese>

O US também possui efeitos atérmicos como o aumento da síntese protéica, aumento da permeabilidade celular, aumento do fluxo de íons de cálcio e metabólitos através da membrana celular afetando de forma positiva a reparação tecidual. Que são essencialmente produzidos por elementos físicos como a cavitação, ondas estacionárias, correntes acústicas e micromassagem (OLSSON, 2005; SILVEIRA, 2010).

A ação terapêutica das ondas ultrassônicas reside na ação sobre biomarcadores de regeneração muscular, principalmente de lesões por contusões, uma vez que este produz mudanças na permeabilidade da membrana e estimula o transporte de substâncias de mensageiros secundários, como o cálcio através da membrana celular. Devido a essas características é que a sua utilização pode ser associada com fármacos como os antioxidantes e os antiinflamatórios através do método da fonoforese, com o objetivo de potencializar os efeitos cicatrizantes dessas duas terapias (RIBEIRO, 2009; SOUZA, 2013).

Fellingner e Schmid (1954) descreveram o primeiro estudo sobre a associação de ultrassom com o uso de hidrocortisona para o tratamento de poliartrite para os dedos da mão. Desde então várias pesquisas têm sido realizadas para se esclarecer quais seriam os mecanismos de ação da fonoforese (MUNIZ, 2009). Dentre essas pesquisas podemos destacar algumas poucas realizadas com o objetivo de elucidar a ação da fonoforese com utilização de fármacos de origem natural, como a copaíba e a andiroba, por exemplo (ORELLANA e KOBAYASHI, 2006).

A fonoforese apresenta algumas vantagens terapêuticas relacionadas à sua forma de uso, pois sendo tópica penetra nos tecidos, sem passar pelo fígado, diminuindo a eliminação metabólica das substâncias, sendo menos agressivo ao trato gastrointestinal e menos traumático ao paciente, promovendo a diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos, pois as concentrações dos fármacos podem ser menores que as utilizadas nos outros métodos e possui ação local sobre o trauma. No entanto, deve ser observada a permeabilidade e a transmissibilidade de cada fármaco antes da aplicação (BRASILEIRO, ALVES, ESCÓSSIA, 2003; POLACOW *et al.*, 2004; VICTOR, 2012).

3 OBJETIVOS

GERAL:

Avaliar a ação terapêutica do gel fitoterápico do OR de *C.duckei* administrado de forma tópica e associado ao método de fonoforese sobre a fase inflamatória do processo de reparação muscular.

ESPECÍFICOS:

- Avaliar a toxicidade dérmica do gel fitoterápico de copaíba da espécie *C.duckei* administrado como tratamento tópico e por fonoforese;
- Analisar a transmissibilidade das ondas ultrassônicas através do gel de *C.duckei* a 10%;
- Avaliar o efeito do gel de *C.duckei* a 10% sobre o estrato córneo da pele após sua administração por fonoforese;
- Analisar os efeitos terapêuticos do gel fitoterápico de copaíba da espécie *C.duckei* utilizado como tratamento tópico e por fonoforese na fase inflamatória do processo de reparação de uma lesão muscular de origem traumática.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRINCÍPIOS ÉTICOS DA PESQUISA

Esta pesquisa seguiu as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e legislação nacional para vivissecção animal em vigor (Lei federal 6.638 de 08 de maio de 1979), que define normas para a realização de pesquisas com animais de laboratório, e da lei n. 9605/98 que versa sobre crimes ambientais.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará segundo o parecer N° 09007-2013 (ANEXO A). Foi cadastrado e aprovado no SISBIO/ICMBio com obtenção da autorização sob N° 44266-2 (ANEXO B).

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas de polipropileno com medidas de 41cmx34cmx16cm, forradas com maravalha, acomodando cinco animais em cada um destes microambientes. Estes foram observados durante um período mínimo de quinze dias antes do início do estudo propriamente dito a fim de promover a melhor adaptação ao ambiente do laboratório, seguindo as diretrizes do COBEA (2006) que define este como período mínimo de pré-observação dos animais antes de qualquer estudo científico.

O laboratório de experimentação teve acesso restrito aos autores desta pesquisa e demais membros do laboratório, apresentando condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro; ambiente higienizado; temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ventilação adequada), além da oferta de alimento e água *ad libitum* aos animais durante todo o período.

4.2 TIPO DE ESTUDO

Este trabalho foi realizado através de uma pesquisa experimental, por meio de uma abordagem qualitativa e quantitativa, observando-se o comportamento de uma amostra específica, durante um intervalo de tempo definido.

Este estudo pode ainda ser considerado como uma pesquisa analítica, do tipo comparativo, prospectivo, coorte, intervencional, transversal, por meio de um ensaio clínico randomizado, duplo cego, com a utilização de grupo controle.

4.3 LOCAL E PERÍODO

O desenvolvimento da pesquisa ocorreu nos laboratórios de Morfofisiologia Animal, Farmacologia, Sanidade Animal e Biotecnologia vegetal da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) em Santarém. E em laboratórios parceiros, Celso Matos em Santarém-PA e Costa Amaral em Belém-PA. E na farmácia de manipulação Bioativa em Santarém-PA. A pesquisa e a coleta dos dados ocorreram no período entre maio de 2013 e maio de 2015.

4.4 AMOSTRA

Para esta pesquisas foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* e linhagem Wistar, machos e fêmeas de acordo os protocolos de pesquisa utilizados. Em número de 40 (quarenta), machos adultos, sadios, com idade superior a 90 (noventa) dias e peso entre 300 (trezentos) e 350 (trezentos e cinquenta) gramas. E em número de (sessenta) fêmeas, com idade superior a 60 dias e peso entre 200 (duzentos) e 300 (trezentos) gramas. Todos provenientes do biotério da UFOPA, Campus Tapajós.

Os animais foram divididos em grupos compostos por cinco animais cada (n=5), distribuídos de forma aleatória.

4.5 MATERIAL BOTÂNICO UTILIZADO E FORMULAÇÃO EM GEL 10%

Nessa pesquisa foi testada a formulação em gel do OR da espécie *C. duckei*, para tanto o OR da espécie selecionada e utilizada na pesquisa foi proveniente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), Km 83, coletado no período chuvoso, de árvores já identificadas e georreferenciadas. Sendo que suas exsicatas estão depositadas no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental, sob registro *C. duckei* – NID 69/2011.

A caracterização química do OR *C. duckei* foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) em parceria com o Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas da Universidade de Santa Maria. Conforme protocolo descrito no anexo C.

Para o ensaio biológico o OR foi manipulado com gel hidroalcoólico, para uma formulação em gel na concentração de *C. duckei* a 10%, de acordo com protocolo

recomendado pela Farmacopéia Brasileira (2011) (Figura 8) e manipulado por farmácia de manipulação credenciada de acordo com o protocolo gel base de carbopol (Anexo D) e conforme parecer técnico apresentado (Anexo E).

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
Fase A	
EDTA dissódico	0,1 g
glicerina	5 g
solução conservante de parabenos	3,3 g
álcool etílico a 70% q.s.p.	100 g
Fase B	
carbômero 980 (polímero carboxivinílico)	1 g
Fase C	
trietanolamina em solução aquosa a 50%	0,6 g

Figura 8 - Componentes da base farmacêutica em gel hidroalcoólico determinada pela Farmacopéia Brasileira, 1ª edição (2011).

Fonte: Formulário de fitoterápicos da farmacopéia brasileira (2011).

A escolha da manipulação do gel de OR copaíba na concentração a 10% baseou-se nas recomendações da Farmacopéia Brasileira (2011) para outros OR de copaíba na formulação em pomada (Figura 9A) e para outras formulações em gel (Figura 9B). E por ser a formulação em gel a mais indicada para a utilização na técnica de fonoforese.

A POMADA DE *Copaifera langsdorffii* Desf., POMADA DE *C. multijuga* (Hayne) Kuntze, POMADA DE *C. reticulata* Ducke E POMADA DE *C. paupera* (Herzog) Dwyer.

SINONÍMIA

C. nitida Mart. ex Hayne, *C. sellowii* Hayne (*C. langsdorffii*), *C. langsdorffii* var. *peruviana*, *C. reticulata* var. *peruviana* (*C. paupera*).

NOMENCLATURA POPULAR

Copaíba.

FÓRMULA

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
óleo-resina de copaíba	10 g
pomada de lanolina e vaselina	100 g

Figura 9A - Recomendação da Farmacopéia Brasileira (2011) para pomadas contendo OR de diferentes copaíbas.

Fonte: Formulário de fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (2011).

B

GEL DE *Arnica montana* L.

SINONÍMIA.

Não consta.

NOMENCLATURA POPULAR

Arnica.

FÓRMULA

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
extrato glicólico de arnica	10 mL
gel base q.s.p.	100 g

Figura 9B - Recomendação da Farmacopéia Farmacopéia Brasileira (2011) para formulação em gel de arnica.
 Fonte: Formulário de fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (2011)

4.6 DETERMINAÇÃO DO pH E DA TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA DO GEL DE *C.duckei* 10%

O pH do gel manipulado de OR *C.duckei* 10% foi analisado com o objetivo de esclarecer se existia algum potencial de irritação para a pele. Isso foi realizado através de um pH-metro digital e por fitas de pH e os resultados comparados com o pH do gel carbopol comercial e com o pH da água destilada.

Para tanto foi utilizado um pH-metro digital da marca *MS TECNOPON Instrumentação* (Figura 10). Inicialmente o aparelho foi calibrado com soluções padronizadas em 4,00 e 7,00, com solução tampão ácidos cítrico/hidrogênio e fosfato de sódio. Foi necessária a utilização de gel de *C.duckei* 10% em quantidade suficiente para que o bulbo do eletrodo do pH-metro fosse completamente recoberto por ele. Após a medição de cada gel o eletrodo foi lavado com água destilada, limpo com ácido acético a 4%, e novamente lavado com água destilada, logo após seco com papel absorvente e a calibração conferida aguardando-se 3 minutos entre e para cada leitura, em temperatura ambiente de 25°C. Sendo que foram realizadas três medições sequenciais por amostra, tomando-se a média dos valores obtidos como resultado.



Figura 10 – pHmetro digital.
Foto: Daliane Marinho

Com o objetivo de analisar o potencial de irritação para a pele do gel de OR de *C. duckei* e do próprio OR de *C. duckei* foi realizada além da análise do pH também os testes de toxicidade dérmica aguda e cumulativa, conforme protocolos específicos que serão descritos posteriormente. A fim de analisar a segurança da formulação a 10% para sua aplicação tópica sob a pele e sobre os parâmetros hematológicos.

4.7 ANÁLISE DA TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA

Para determinação da toxicidade dérmica após uma exposição única, foram testados os géis de OR de *C. duckei* nas concentrações teste a 10%, utilizada no teste de aplicabilidade terapêutica e também nas concentrações de 25%, 50% e 75% de OR de *C. duckei* a fim de testar o potencial corrosivo dessas concentrações de OR em sua formulação em gel para a pele. Para isso foram utilizadas as recomendações da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD/OCDE) através de seu protocolo OCDE 404, que visa analisar a irritação e corrosão da pele após a aplicação única de uma substância.

Conforme prevê o protocolo OCDE 404 foi realizado um ensaio clínico prévio para determinação do potencial corrosivo da substância a 100% de sua concentração, ou seja, o OR puro de *C.duckei*, com apenas um animal e após isso foram iniciados os testes com a administração das doses teste em suas concentrações preconizadas em 25%, 50% e 75% da copaíba conforme os grupos de experimento.

Para o teste foi realizada uma única aplicação tópica de um gel de *C.duckei* nas concentrações de 25%, 50% e 75% sobre o dorso do animal em uma área de 6cm². Tal área foi epilada 24h antes da aplicação e após a observação de sua integridade foi aplicada a substância teste determinada para o grupo. Após a aplicação o local foi recoberto por gaze e fita não irritativa. Após 4h a área foi limpa, toda substância foi retirada e seguiu-se a primeira avaliação do aspecto da pele. Uma segunda avaliação ocorreu 24h após a primeira administração.

As avaliações ocorreram de forma cega através de duas inspeções visuais, onde dois examinadores de forma independente determinaram seus *scores* de classificação. Estes valores foram utilizados para determinação do *score* final da substância com base na média dos valores obtidos.

Para este experimento foram utilizados 16 ratos *wistar*, fêmeas, com idade superior a 90 dias, peso variando entre 200 e 250g, divididos em três grupos com (n=5) e um apenas foi utilizado no teste de potencial corrosivo com o OR puro ou “*in natura*” (100%).

Como dito anteriormente, a avaliação dos resultados ocorreu de forma qualitativa por dois observadores de forma cega, de acordo com as duas classificações pré-determinadas pelo protocolo “*Formação de eritema e escaras*” e “*Formação de edema*” (Figura 11 A, B). Ao final a média dos *scores* obtidos foi considerada e obteve-se a classificação da substância em: não-irritante, irritante moderado, irritante grave e corrosivo. Segundo quadros apresentados nas imagens abaixo (Figura 11 C).

A Formação de eritema e escaras

Lesão	Valor
Sem eritema	0
Eritema leve (apenas perceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (vermelho violeta) com escaras	4

B Formação de edema

Lesão	Valor
Sem edema	0
Edema leve (apenas perceptível)	1
Edema bem definido (bordas menores que 1 mm)	2
Edema moderado (bordas de 1 mm)	3
Edema grave (bordas com mais de 1 mm e não restrito às regiões de aplicação)	4

C

0,0 – 1,0 = não irritante

1,1 – 2,0 = irritante moderado

2,1 – 3,0 = irritante grave

3,1 – 4,0 = corrosivo

Figura 11 - Quadros de classificação do Protocolo OECD/OCDE 404. A) Formação de eritema e escaras; B) Formação de edema. C) *Score* geral de classificação da substância com base nas médias das avaliações dos examinadores.

Fonte: *Federal Hazardous Substances Act of the USA* (2014).

4.8 ANÁLISE DA TOXICIDADE DÉRMICA APÓS DOSES CUMULATIVAS

Também para determinação da toxicidade dérmica e do potencial irritativo dos géis de OR de *C.duckei* foi realizado os testes de toxicidade dérmica em doses cumulativas. Para tal foram utilizadas as mesmas substâncias testadas no teste OCDE 404. No entanto, para esta análise seguiu-se as recomendações adaptadas do protocolo OECD 410.

O protocolo OCDE 410 visa analisar o grau de toxicidade sobre os sistemas orgânicos de uma substância após exposições repetidas durante 21 ou 28 dias de exposição. No entanto, para esta pesquisa também foi utilizada a escala de avaliação do grau de irritação/corrosão dérmica após exposição aguda, preconizado pelo protocolo OCDE 404, a fim de avaliar tal potencial sobre a pele durante os 21 dias de exposição às substâncias testadas, bem como após exposições repetidas ao OR puro.

Para este experimento foram utilizados 23 ratos *wistar*, fêmeas, com idade superior a 90 dias, com peso variando entre 200 e 250g, divididas em quatro grupos com (n=5). Os grupos teste foram: grupo 75%, 50%, 25% e controle. E três animais foram utilizados previamente para o teste com OR puro em aplicações repetidas.

Como no teste anterior, as substâncias teste deste foram: os géis de *C.duckei* nas concentrações de 25%, 50% e 75% do gel de OR. Estas foram aplicadas sobre a pele epilada do dorso do animal em uma área correspondente a 10% do tamanho corporal. Tal epilação ocorreu como no teste anterior 24h antes da aplicação em duas áreas no dorso dos animais, sendo uma área utilizada campo controle e a outra como campo para o teste.

Sobre o local epilado designado para o teste foi aplicado diariamente o gel teste de acordo com a divisão de grupos. Sendo que um grupo não recebeu nenhuma substância. Este foi utilizado como grupo controle.

Após a aplicação a área foi recoberta por gaze e fita não irritativa. E assim este permaneceu por 6h diariamente durante 7 dias por semana, após as 6h de exposição a área foi lavada com água corrente e sabão neutro e toda substância foi retirada. Seguiram-se aplicações diárias, com intervalos de 24 horas entre cada uma delas, sendo sempre recoberta a área e removida a substância após 6h de exposição.

Após os 21 dias de exposição determinados ocorreu a coleta de sangue dos animais sob estado de sedação e em seguida a sua eutanásia e autópsia para observação dos órgãos internos e coletas para avaliação da massa relativa de órgãos como rins e fígado.

Os dados obtidos foram analisados através de parâmetros qualitativos, como a classificação quanto ao grau de irritação/corrosão sobre a pele, como já descrito anteriormente no protocolo OCDE 404, e através de parâmetros quantitativos pela avaliação da massa relativa dos órgãos rins e fígado e de parâmetros sanguíneos para análise hematológica. Conforme descrição abaixo:

Análise Hematológica: foram analisados parâmetros hematológicos como contagem total de hemácias, hematócrito, hemoglobina, total de leucócitos e absoluta de linfócitos, monócitos e granulócitos, além da contagem total de plaquetas. Essa análise ocorreu através do analisador hematológico *Mindray BC-2800 Vet*.

Os resultados obtidos foram analisados levando-se em consideração os parâmetros hematológicos conhecidos para ratos e em comparação com o grupo controle. E seus resultados foram expressos através de valores numéricos.

4.9 APARELHO DE US E PARÂMETROS UTILIZADOS

O OR de *C. duckei* manipulado foi utilizado em um teste terapêutico quanto à eficácia do mesmo na recuperação de uma lesão muscular induzida. E para a pesquisa foi testado através da sua aplicação de forma tópica e através da técnica de fonoforese, que consiste na utilização desse gel como meio de acoplamento para o aparelho de ultrassom (US) terapêutico.

Para o teste de aplicação terapêutica foi realizada a lesão muscular induzida e 24 horas após da ocorrência da lesão os animais iniciaram as sessões diárias de terapia para cada grupo teste, determinadas de forma aleatória para cada grupo.

O aparelho gerador de ondas ultra-sônicas utilizado foi o *Sonopulse Special* fabricado pela Ibramed, um aparelho de ultrassom de 1 e 3MHz, com ERA de 3,5cm² e 1 cm² (Figura 12).



Figura 12 - Aparelho de US utilizado.
Fonte: Site Shopfísio, 2014

Os parâmetros físicos do ultrassom utilizados no teste terapêutico, tanto na aplicação convencional como no método de fonoforese foram: frequência de 1 MHz, com área de irradiação efetiva (ERA) reduzida de 1 cm²; modo de corrente pulsado (frequência do pulso = 100Hz – 20%); intensidade média de 0,6 W/cm²; tempo de aplicação de 1 min/cm², através de contato direto, em movimento circular horário do cabeçote em toda a extensão da região do dorso e membro posterior direito. Tais parâmetros foram selecionados com base na pesquisa de Camargo (2006) e Koeke (2005).

O gel de ultrassom que foi utilizado no grupo de teste apenas com o US convencional após a lesão induzida é uma substância colóide, incolor e composta de Polímero Carboxivinílico, Imidazolidil uréia, Metil parabeno, 2 amino, 2 metil, 1 propanol e água deionizada. Com pH = 6,5 a 7,0 (Neutro).

4.10 AVALIAÇÃO DA TRANSMISSIBILIDADE DAS ONDAS ULTRASSÔNICAS

Com o objetivo de avaliar o potencial de transmissibilidade do gel e sua viabilidade técnica na utilização terapêutica foi realiza a avaliação da transmissibilidade desse gel de OR

de *C. duckei* a 10% com a utilização do mesmo aparelho de US, o *Sonopulse Special* Ibramed, operando na faixa de 1 MHz, com área de aplicação ERA de 3,5 cm² e 1cm², calibrado através de uma balança ultra-sônica da marca *Ohmic*. Em sistema de análise que contou ainda com uma balança semi-analítica da marca *Gehaka*, água destilada, gel hidroalcoólico e gel de *C. duckei* a 10%.

Os dados obtidos na aferição para o gel de *C. duckei* a 10% foram analisados e comparados com os valores obtidos pelo teste para análise da transmissibilidade com água destilada. Para tanto estes foram analisados de forma qualitativa e quantitativa.

Para a análise qualitativa do gel foi utilizado o modelo proposto por Cameron e Monroe (1992). Nesse modelo foi fixado em volta do cabeçote ultrassônico um adaptador de acrílico. Em seguida foi colocada uma camada de cinco milímetros de espessura do gel a ser analisado sobre a superfície do cabeçote, sendo que esta foi aferida por meio de uma régua milimetrada. Após esse procedimento foi colocada uma camada de água até esta atingir uma espessura também de cinco milímetros recobrimdo toda a área do gel (Figura 13 A-B).

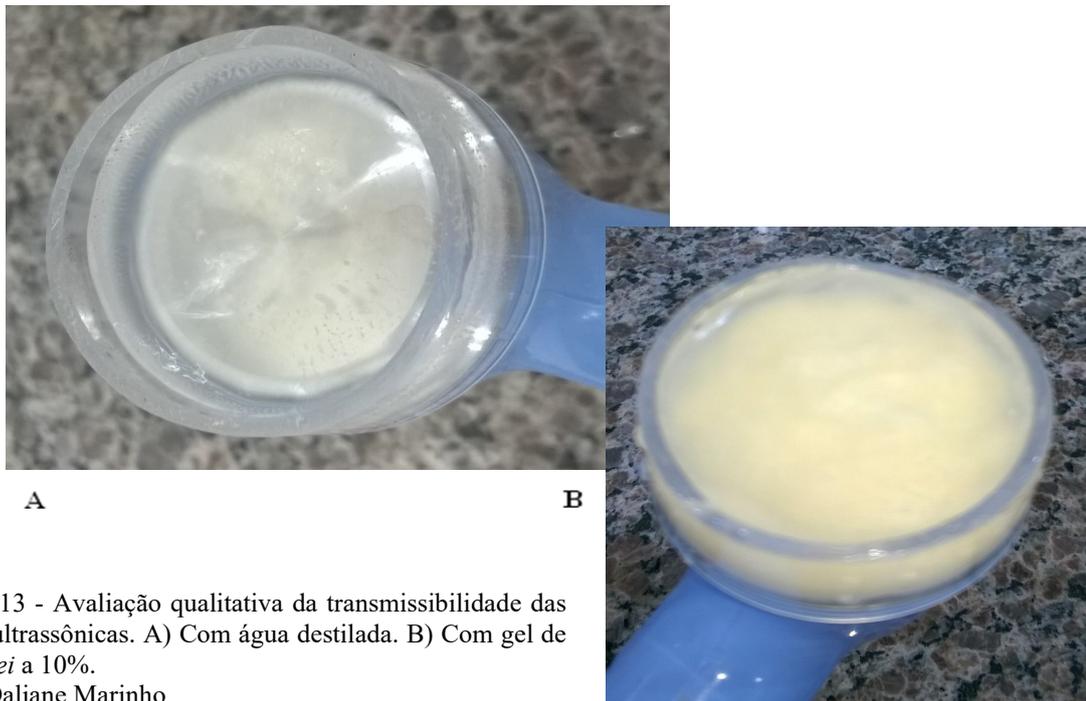


Figura 13 - Avaliação qualitativa da transmissibilidade das ondas ultrassônicas. A) Com água destilada. B) Com gel de *C. duckei* a 10%.

Foto: Daliane Marinho

O US foi programado na frequência de 1 MHz com área de irradiação efetiva com ERA de 3,5cm² e modos de corrente pulsados e contínuo. Sendo que no modo pulsado foi

testado com frequência do pulso = 100Hz – 20% e 50%; intensidade média variando de 0,2 a 1,0 W/cm² (0,2/0,4/0,6/0,8/1,0) e tempo de aplicação de 1 min/cm².

Na análise qualitativa os géis poderiam ser classificados como:

1. "Condutibilidade negativa": utilizado para os géis que não produziram movimentação na superfície da água no sistema de teste. E excluídos da análise quantitativa do experimento.

2. "Condutibilidade positiva": utilizado para os géis que produziram movimentação na superfície da água no sistema de teste e submetidos à análise quantitativa.

A análise quantitativa da condução ultrassônica dos medicamentos foi realizada com o controle ambiental da temperatura (variando de 22 a 26°C) e da umidade relativa do ar (entre 65% e 75%) durante todo o experimento.

Sobre uma balança analítica foi posicionado um recipiente de plástico e neste foi inserido um cone de metal e em seguida colocado água destilada de modo a recobrir todo o cone. No cabeçote do US foi colocado o mesmo adaptador de plástico de cinco milímetros, utilizado na avaliação qualitativa, sobre o qual foi depositado separadamente os géis de carbopol e *C. duckei* 10%. Posteriormente, o cabeçote foi envolto por um filme de PVC transparente recobrendo toda sua superfície. A fim de evitar vazamento do medicamento quando o cabeçote com a adaptação foi imergido no recipiente com água destilada. Sendo que cuidados foram tomados para evitar a formação de bolhas de ar. O cabeçote do US foi então posicionado de forma a ficar imerso na água sem tocar a extremidade do cone. Em seguida, o equipamento foi ligado na modalidade teste de US (Figura 14).

Para análise dos resultados foi considerado que quanto maior o valor registrado pelo *display* da balança maior a energia ultrassônica transmitida pelo cabeçote do equipamento. Os testes foram iniciados com a quantificação da água, tomada como parâmetro para a análise dos géis, a qual foi mensurada por cinco vezes, a fim de atingir maior índice de confiabilidade. Descartando-se o maior e o menor valor obtidos.

Cada um dos géis foi submetido a três procedimentos de teste e o valor registrado na balança, em cada uma das potências ultrassônicas utilizadas foi coletado para posterior análise. A média de transmissão ultra-sônica atingida por cada um dos géis com seus respectivos desvios padrão foi classificada em termos percentuais, tomando-se por referência os valores obtidos pela energia transmitida pelo US através da água (ou seja, sem meios de acoplamento).



Figura 14 - Esquema do equipamento de avaliação quantitativa baseado no modelo proposto por Cameron e Monroe (1992).

Foto: Daliane Marinho

Os géis foram considerados "bons transmissores" quando com valores iguais ou superiores a 80% dos encontrados pelo US isolado, usando a água como meio de transmissão; os que permitiram entre 40% e 79% de passagem da onda foram classificados como de "transmissão moderada" e os com índices menores que 40% foram considerados "transmissores pobres".

4.11 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA PELE

A análise da pele foi realizada segundo o protocolo da pesquisa de Chorilli *et al.* (2004) para avaliação comparativa quanto à capacidade de abertura do estrato córneo dos géis utilizados na terapia com US, a fim de se observar se o gel de copaíba a 10% teria a capacidade de abertura desse estrato permitindo a passagem dos agentes farmacológicos presentes no OR de *C. duckei* utilizado. O que consistiria em uma dos benefícios da técnica de fonoforese, a aplicação de fármacos associados a ondas de US através da pele.

Para análise histológica da pele foram utilizadas 20 ratas fêmeas, com idade superior a 90 dias, sadias, nulíparas, com peso variando entre 200 e 250g. Estas foram divididas em quatro grupos iguais com n=5 de acordo com a terapia recebida. Sendo que estes grupos

foram denominados: grupo US com gel carbopol; grupo US com gel de copaíba a 10%; grupo uso tópico do gel de copaíba a 10% sem US e grupo controle, apenas epilação e sem nenhuma forma de tratamento administrado.

Os parâmetros do aparelho de US utilizados foram os mesmos daqueles utilizados no protocolo de ação terapêutica que serão descritos posteriormente. E para a aplicação tópica foram realizados o espalhamento do gel de *C. duckei* 10% com o cabeçote do aparelho de US desligado por 1 minutos, de forma circular.

Os grupos experimentais sofreram uma área de epilação, com certa de 6cm² no dorso do animal, 24h antes de receberem o tratamento determinado. Os animais dos grupos receberam uma única sessão de terapia e em seguida seguiu-se o procedimento de eutanásia conforme protocolo já descrito, e a extração da pele para análise posterior.

A pele extraída foi fixada em *Bouin* por 24 h, depois lavada com álcool 50% e conservadas em álcool 70%. Em seguida estas foram processadas histologicamente, cortadas de forma transversal e coradas com hematoxilina-eosina. Sendo que para as análises histopatológicas por área de tratamento de cada animal foram obtidos dez cortes transversais de 6-7 µm de espessura, não seriados.

Para análise dos resultados da espessura das camadas da pele foram obtidas cinco medidas feitas aleatoriamente nos cortes. A espessura da camada córnea foi obtida em micrômetros (µm).

A camada córnea foi mensurada em cinco diferentes áreas onde esta apresentar-se bem aderida à epiderme e foi considerada a distância entre a porção superior da camada granulosa até a superfície, através de microscopia óptica, com análise e captura de imagem através do *Software* Módulo de Imagem *Motic live 2.0*, com resolução 1280x1024. Para a epiderme foram obtidas medidas em áreas planas, sem muitas papilas dérmicas, através da distância entre a membrana basal até a borda externa da camada córnea. Assim foi avaliado o tamanho e a disposição da camada córnea.

Assim, para a análise da espessura da camada córnea foi considerado como tendo bom resultado se o gel conseguir modificar a camada córnea da pele, promovendo seu alargamento e permitindo assim a penetração do OR de *C. duckei* no tecido muscular através da pele.

Avaliação dos resultados foi realizada através de dados qualitativos, quanto a abertura ou não da camada córnea, e quantitativos, quanto a espessura.

4.12 TÉCNICA DE INDUÇÃO ANESTÉSICA E EPILAÇÃO

Para a epilação do dorso dos animais utilizados nos testes de toxicidade descritos acima e para o teste de aplicação terapêutica foram necessárias a utilização de condutas anestésicas e de eutanásia, para o último. Sendo que a técnica de indução anestésica empregada em ambos foi o método de injeção intraperitoneal de cetamina (0,10ml/100g) e xilazina (0,25 ml/100mg), conforme recomendações do CEUA/UFOPA. E para a eutanásia foi a superdose de anestésico.

Para o teste terapêutico o primeiro dia foi o de produção da lesão traumática e epilação, ambos sob indução anestésica.

Já a epilação ocorreu nas áreas do dorso numa área de 6cm² para os testes de toxicidade e no membro posterior direito dos animais para o teste de aplicação terapêutica.

4.13 PRODUÇÃO DA LESÃO TRAUMÁTICA

Para o protocolo de pesquisa experimental escolhido para o teste da ação terapêutica do gel de OR de *C.duckei* a 10% sobre a fase inflamatória do processo de reparação muscular foi realizada a produção de lesões traumáticas padronizadas. Estas ocorreram sob efeito anestésico, com um mecanismo de contusão tipo queda livre, adaptado de McBrier (2009), que consistiu em uma plataforma dupla de madeira transpostas em seu centro por uma peça de Policloreto de Vinila (PVC) (Imagem 15A).

A lesão foi provocada pela liberação de um cilindro metálico de 267g de massa, liberado a uma altura de 60cm, que percorreu o trajeto interior da peça de PVC e então atingiu o ventre dos músculos gastrocnêmio e sóleo do membro posterior direito. Com grau de lesão muscular considerado como “intenso” segundo a classificação de McBrier (2009).

Para provocar a lesão no membro posterior selecionado, o animal foi posicionado sob estado anestésico e em decúbito ventral, sobre a tábua de base do mecanismo lesional com o membro no centro da porção terminal da peça de PVC. O membro a ser lesionado foi então posicionado em rotação externa e abdução, para que os músculos gastrocnêmio e sóleo ficassem voltados para cima (Figura 15B).

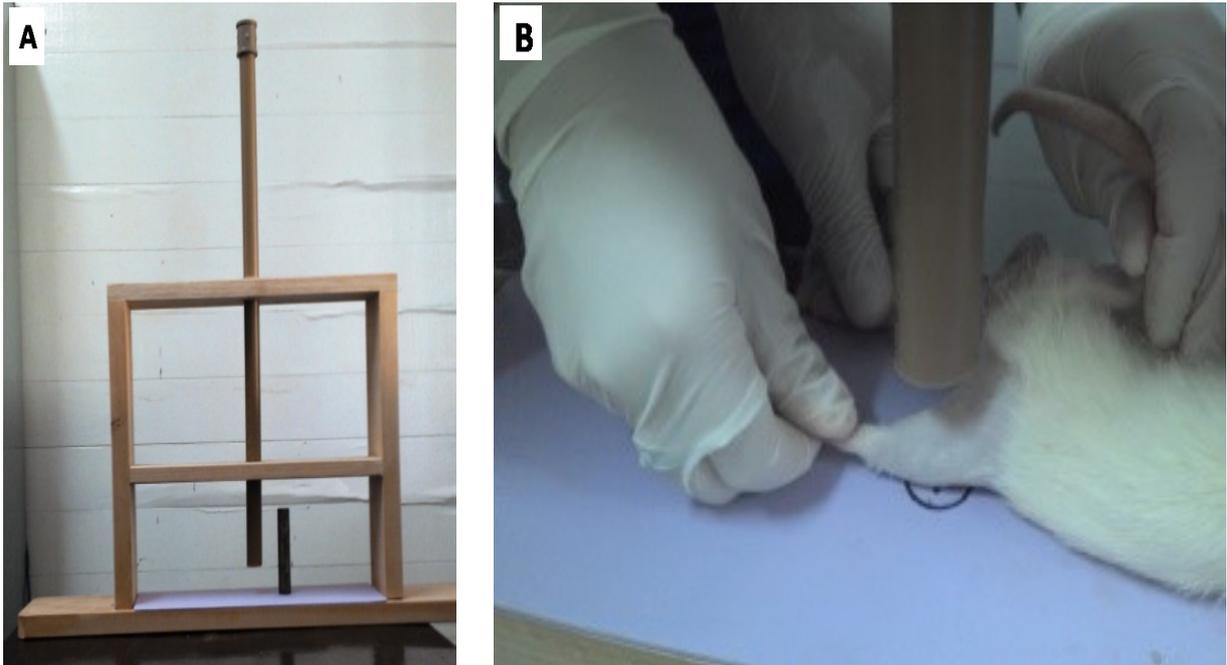


Figura 15 – Produção da lesão traumática. A) Mecanismo de produção da lesão traumática adaptado de McBrier (2009). B) Posicionamento do membro posterior esquerdo do animal para a produção do trauma. Foto: João Oliveira.

4.14 AÇÃO TERAPÊUTICA COM O GEL DE *C. duckei* 10%

Foi desenvolvido um protocolo de teste com o objetivo de analisar a ação terapêutica do gel de *C. duckei* a 10% aplicado de forma tópica e por fonoforese sobre a fase inflamatória do processo de reparação muscular decorrente de uma lesão muscular de origem traumática.

E para análise do efeito terapêutico foram utilizados 40 ratos machos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *wistar*, sadios, com idade superior a 90 dias, peso variando entre 300 e 350 gramas, mantidos em ambiente controlado com água e ração a vontade.

Os animais foram divididos em quatro grupos com n=10. Estes estavam sob estado anestésico quando receberam uma lesão muscular experimental, padronizada, do tipo traumática, por mecanismo do tipo queda livre sobre o músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (procedimentos descritos anteriormente). Após 24h do momento da lesão iniciaram seis dias consecutivos de tratamento e no 7º dia estes sofreram eutanásia com extração do mm. gastrocnêmio e fixação em paraformol 4% para posterior análise histológica.

Cada um dos quatro grupos de pesquisa foram compostos de 2 subgrupos com n=5. Sendo que estes subgrupos foram distintos entre si de acordo com o dia de eutanásia. O

primeiro subgrupo foi identificado como o da eutanásia no 2º dia (48h) após a lesão e o segundo subgrupo foi identificado como o da eutanásia no 7º dia após a lesão.

Os grupos estudados foram assim instituídos:

Grupo controle: Sofreu lesão traumática por contusão e não recebeu nenhuma forma de tratamento. Foram observados por seis dias consecutivos e o mm. gastrocnêmio foi extraído, fixado e analisado histologicamente.

Grupo ultrassom (US) convencional: Sofreu lesão traumática por contusão e como tratamento a aplicação do ultrassom com gel convencional segundo os parâmetros selecionados, através da aplicação por meio do contato direto sobre a área a ser tratada. Na proporção de 0,5ml de gel por aplicação, com uma aplicação a cada 24 horas por seis dias consecutivos. Houveram dois momentos de eutanásia, 24h após a lesão com uma aplicação de tratamento (n=5) e no 7º dia após a lesão, com 6 dias de tratamento (n=5).

Grupo gel de copaíba 10% uso tópico: Sofreu lesão traumática por contusão e como tratamento a aplicação do gel de *C. duckei* a 10% na forma tópica. Na quantidade de 0,5 ml de gel por aplicação, sendo uma aplicação a cada 24 horas por seis dias consecutivos. O espalhamento do gel foi realizado com o próprio cabeçote do aparelho desligado, em movimentos circulares de forma lenta, por um período de um minuto, evitando assim provocar aquecimento por fricção. Na proporção de 0,5ml de gel por aplicação, com uma aplicação a cada 24 horas por seis dias consecutivos. Houve dois momentos de eutanásia, 24h após a lesão com uma aplicação de tratamento (n=5) e no 7º dia após a lesão, com 6 dias de tratamento (n=5).

Grupo copaíba fonoforese: Sofreu lesão traumática por contusão e como tratamento a aplicação do ultrassom com gel de *C. duckei* a 10%, segundo os parâmetros selecionados, através da aplicação por meio do contato direto sobre a área a ser tratada. Na proporção de 0,5ml de gel por aplicação, sendo uma aplicação a cada 24 horas por seis dias consecutivos. Na proporção de 0,5ml de gel por aplicação, com uma aplicação a cada 24 horas por seis dias consecutivos. Houveram dois momentos de eutanásia, 24h após a lesão com uma aplicação de tratamento (n=5) e no 7º dia após a lesão, com 6 dias de tratamento (n=5).

Como já mencionado anteriormente, a técnica de eutanásia a ser utilizada para este estudo foi a de superdose de anestésicos, através do método de injeção intraperitoneal, com aplicação de uma superdose (overdose) da combinação de quetamina e xilazina (três vezes a dose anestésica).

O músculo extraído após a eutanásia foi armazenado em paraformol a 4% e seguiu-se para processamento histopatológico. As amostras passaram por um processo de desidratação através de 6 banhos de álcool de 1 hora de duração cada, em concentrações progressivas de 75%, 85%, 95%, 100%, 100% e 100%.

Após a desidratação as amostras foram submetidas à diafanização com dois banhos consecutivos em xilol de 1 hora de duração cada. Na fase seguinte foi realizada a parafinização onde as amostras foram imersas em cubos de parafina líquida à 75°C. Após o resfriamento e a solidificação da parafina foi obtido um bloco que na fase seguinte foi levado ao micrótomo para o corte histológico na espessura de 05 micrômetros. Após a desparafinização esses cortes foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE), montados com lamínula, para posteriormente ser analisados ao microscópio óptico comum e fotografados.

A fotografia foi realizada através de uma câmera de microfotografia conectada a um microcomputador. As fotografias a serem analisadas foram obtidas através de um aumento de 4x, 10x e 40x, como exemplo na figura 16 A e B.

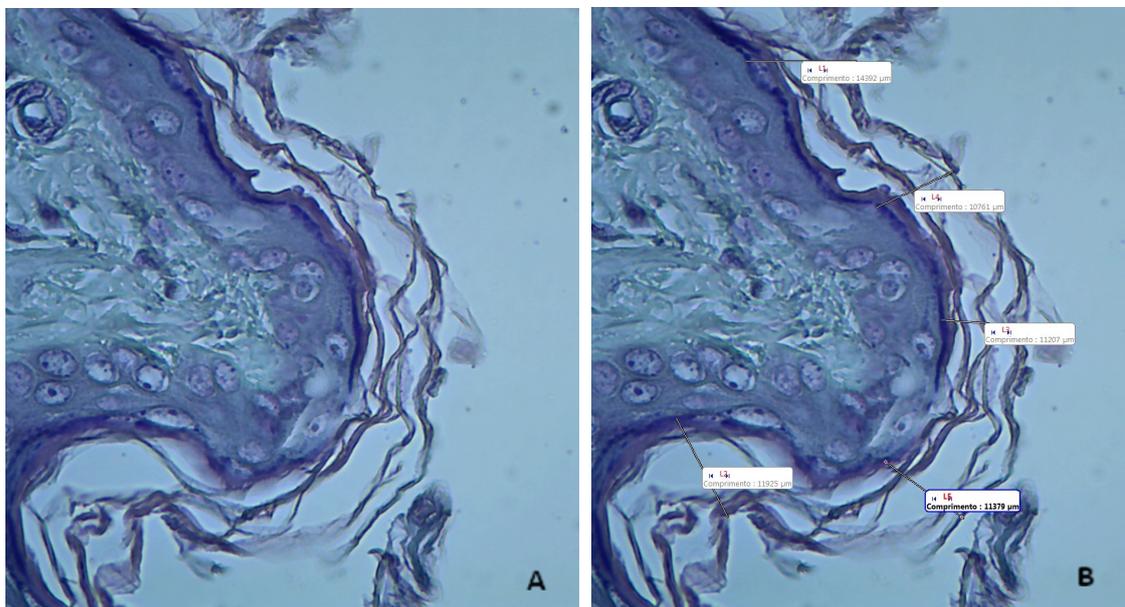


Figura 16 – Avaliação da abertura do estrato córneo. A) Fotografia do corte histológico apresentando a abertura da camada córnea, objetiva de 4x. B) Fotografia do corte histológico com as cinco medidas tomadas da abertura da camada córnea, objetiva de 4x.

Foto: Daliane Marinho.

A análise histopatológica foi realizada de forma cega e com a utilização de microscopia óptica de forma quantitativa. Para isso teve por objetivo definir graus e valores para as

seguintes variáveis de interesse: 1. células com núcleos centralizados; 2. fibrose; 3. edema; 4. necrose e 5. células de infiltrado inflamatório.

Para análise quantitativa foram tomadas as medidas de um campo de análise aleatório, onde foram mensuradas as áreas em micrômetros de fibrose, de edema e necrose, já para os itens células do infiltrado inflamatório e de células com núcleo centralizado estas foram quantificadas por número de células/campo selecionado. Para isso foi utilizado um microscópio com câmera acoplada e as medidas foram tomadas através do *Software* Módulo de Imagem *Motic live 2.0*, com resolução 1280x1024.

Para as áreas de fibrose e edema e para contagem do número de células do infiltrado inflamatório foi utilizada a objetiva de 4x, para as áreas de necrose foi utilizada a objetiva de 10x e para núcleos centralizados as objetivas de 4x e 10x (quando do pequeno número de células por campo selecionado, a fim de evitar erro na análise).

Uma vez que foram utilizados vários itens de análise histopatológica os resultados foram atribuídos por variáveis ordenativas e numéricas foram empregados diferentes testes estatísticos para as comparações entre os grupos e subgrupos.

4.15 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados relativos a estas análises foram armazenados e tabulados em planilhas do *software Microsoft Excell 2007*, e posteriormente receberam o tratamento estatístico pelo *software BioEstat 5.3*. Foram analisados considerando-se suas médias e desvios padrão. E ainda passaram por testes de normalidade com *Shapiro Wilk*, para amostras consideradas normais utilizou-se o teste paramétrico ANOVA e *Tukey* e para amostras consideradas não-normais utilizou-se o teste não-paramétrico de *Kruskall-wallis*, nas comparações múltiplas entre os grupos de estudo. Para este estudo experimental foi admitido o nível mínimo de significância considerando o valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seguem a seguir os resultados encontrados na pesquisa através dos testes realizados. Sendo que inicialmente os resultados serão apresentados quanto às análises realizadas com o gel de *C. duckei* produzido para a pesquisa, seguido dos testes de toxicidade dérmica aguda e cumulativa e pra finalizar os testes de aplicabilidade terapêutica sobre a fase inflamatória do processo de reparação muscular.

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO OR *C. duckei*

O OR de *C. duckei* utilizado foi extraído no período chuvoso de árvores provenientes da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), e posteriormente foi encaminhado para análise cromatográfica de alta resolução no laboratório da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS). E com ele foi manipulada a formulação em gel para os testes de toxicidade e teste de efeito terapêutico. Os resultados obtidos na caracterização química estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise qualitativa e quantitativa do óleoresina de *C. duckei* por cromatografia gasosa de alta resolução. Análise realizada pelo laboratório UFSM/RS.

Componentes	RI ^a	RI ^b	Período seco Área (%)	Período chuvoso Área (%)	Fórmula Molecular
Nafitaleno	1179	1178	0.81	0.32	C ₁₀ H ₈
δ-Elemeneno	1339	1335	0.46	0.19	C ₁₅ H ₂₄
α-Cubebeno	1351	1349	0.97	1.58	C ₁₅ H ₂₄
α-Copaeno	1376	1376	2.13	0.74	C ₁₅ H ₂₄
β-Cariofileno	1404	1403	23.49	15.92	C₁₅H₂₄
<i>t</i> -α-Bergamoteno	1436	1436	8.64	3.73	C ₁₅ H ₂₄
α-Aromadendreno	1439	1445	0.13	4.25	C ₁₅ H ₂₄
α-Humuleno	1454	1455	1.03	1.28	C ₁₅ H ₂₄
Germacreno-D	1480	1480	2.35	4.03	C ₁₅ H ₂₄
α-Amorfeno	1481	1483	-	2.87	
β-Selineno	1485	1485	7.15	11.39	C ₁₅ H ₂₄
α-Muuroleno	1499	1495	2.83	0.96	C ₁₅ H ₂₄
β-Bisaboleno	1509	1510	34.29	28.17	C₁₅H₂₄
δ-Cadineno	1513	1510	1.07	0.84	C ₁₅ H ₂₄

α -Cadideno	1538	1538	4.13	3.59	C ₁₅ H ₂₄
α -Copaeno-11-ol	1544	1539	0.59	-	C ₁₅ H ₂₄ O
Germacreno-B	1556	1561	1.98	1.43	C ₁₅ H ₂₄
Spatulenol	1576	1577	0.62	0.26	C ₁₅ H ₂₄ O
Óxido Cariofileno	1581	1580	3.75	5.08	C ₁₅ H ₂₄ O
Eudesmol	1635	1637	0.43	1.15	C ₁₅ H ₂₆ O
α -Muurolol	1644	1641	1.09	0.73	C ₁₅ H ₂₆ O
α -Cadinol	1653	1665	1.54	0.59	C ₁₅ H ₂₆ O
Cadaleno	1674	1672	0.27	-	C ₁₅ H ₂₈
Total identificado (%)			99.75	89.10	

As proporções relativas dos constituintes do óleo essencial foram expressas em porcentagens. ^aÍndices de retenção da literatura (Adams, 1995). ^bÍndices de retenção experimental (baseado em séries homólogas de *n*-alkane C₇-C₃₀).

As atividades antiinflamatória e antiedematogênica do óleo de copaíba são atribuídas ao sesquiterpeno β -cariofileno, e ao β -bisaboleno é atribuída à atividade apenas antiinflamatória (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; BOAROTO, 2014). Sendo as concentrações de diterpenos e sesquiterpenos presentes no OR de copaíba podem variar entre as diversas espécies, e devido a fatores biológicos como fungos e insetos, além de fatores ambientais, como tipos de solo, clima e sazonalidade (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

No OR de *C. duckei* utilizado nesta pesquisa e coletado na FLONA durante o período chuvoso foi encontrado um percentual de 15.92% de β -cariofileno e 28.17% de β -bisaboleno. Com a análise pode-se comprovar a sua autenticidade através do seu percentual de α -copaeno (VEIGA JUNIOR; PATITUCCI; PINTO, 1997) e a sua aplicabilidade nos testes de ação terapêutica para o tratamento de lesões musculares traumáticas podem ser comprovados através da presença do β -cariofileno e do β -bisaboleno. Estes dois últimos são também os componentes de maior concentração no OR de *C. duckei*.

Segundo Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006) em pesquisa realizada no município de Mojú-PA, em todos os meses do ano a concentração do sesquiterpeno β -bisaboleno na espécie *C. duckei* foi superior a do β -cariofileno, sendo que ocorreram variações nos percentuais das substâncias independente do clima. Esse dado corrobora os resultados encontrados nessa pesquisa e evidencia as afirmativas anteriores de que não existe uma constância na concentração de tais substâncias entre diferentes espécies de copaiba e entre a mesma espécie em diferentes períodos e diferentes regiões, o que se caracteriza como uma especificidade

para a realização de pesquisas, como esta, que objetivam analisar as ações terapêuticas do OR de copaíba.

A pesquisa de Leandro *et al.* (2012) também concluiu que o β -bisaboleno foi o constituinte principal em diversas amostras de *C. duckei*. Assim, podemos observar que essa é uma das características principais do OR de *C. duckei* em diversas regiões e períodos do ano.

Martins-da-Silva, Pereira e Lima (2008) coletaram e analisaram materiais de diversas copaibeiras em diferentes áreas da Amazônia e obteve como resultados que a *C. duckei* ocorre apenas no Brasil, no nordeste da Amazônia brasileira, sendo encontrada desde o nordeste do estado do Pará (região de Belém e Castanhal) até o noroeste do Maranhão (região de Fróes e Santa Luzia). Tal indicação talvez justifique a dificuldade que foi encontrada na obtenção do OR necessário para a realização dessa pesquisa, uma vez que, os exemplares encontrados na FLONA têm a característica de pouca produção de OR de *C. duckei*, com poucos “ml” obtidos a cada coleta, o que foi um fator limitante para a pesquisa, na produção em maior quantidade de uma forma semi-sólida em gel com OR de *C. duckei*.

5.2 AVALIAÇÃO DA TRANSMISSIBILIDADE DAS ONDAS ULTRASSÔNICAS

Quanto a avaliação do potencial de transmissibilidade do gel e sua viabilidade técnica na utilização terapêutica foi realizada a avaliação da transmissibilidade do gel de OR de *C. duckei* a 10% com a utilização do aparelho de US *Sonopulse Special* Ibramed, operando na faixa de 1 MHz, com área de aplicação ERA de 3,5 cm² e 1cm². Foram analisadas a transmissibilidade do gel nas modalidades: contínua, pulsada 20% e pulsada 50%. E nas intensidades 0,2/0,4/0,6/0,8/1,0 W/cm² durante um minuto de aplicação. Sendo que foi feita a análise qualitativa e quantitativa da transmissibilidade do gel de *C. duckei* a 10%.

5.2.1 Avaliação Qualitativa

Na tabela 2 serão apresentados os resultados da avaliação qualitativa que precedeu a avaliação quantitativa da transmissibilidade ultrassônica do gel de *C. duckei* 10% utilizado como meio de acoplamento durante a aplicação terapêutica. Para tanto os resultados do gel de *C. duckei* desenvolvido foram comparados aos da água destilada e do gel carbopol comercial.

Nas intensidades de 0.2 W/cm² no modo pulsado 20% e 50% com o gel de *C. duckei* 10% as ondas de ultrassom não foram observados, ou seja, foram atenuadas pela substância. Sendo assim consideradas como de transmissibilidade negativa para tal intensidade nessas modalidades de tratamento e não passaram para a análise quantitativa. As demais intensidades foram testadas de forma quantitativa.

Tabela 2 – Resultado do teste de transmissibilidade qualitativa do gel de *C. duckei* 10% com o US nos modos contínuo, pulsado 20% e pulsado 50%, com o sistema baseado no modelo proposto por Guirro *et al.* (1996).

Avaliação qualitativa da transmissibilidade				
Modo US	Intensidade (W/cm ²)	Substância testada como meio de acoplamento		
		Gel carbopol	Água destilada	Gel <i>C. duckei</i> 10%
Contínuo	0.2 W/cm ²	+	+	+
	0.4 W/cm ²	+	+	+
	0.6 W/cm ²	+	+	+
	0.8 W/cm ²	+	+	+
	1.0 W/cm ²	+	+	+
Pulsado 20%	0.2 W/cm ²	+	+	-
	0.4 W/cm ²	+	+	+
	0.6 W/cm ²	+	+	+
	0.8 W/cm ²	+	+	+
	1.0 W/cm ²	+	+	+
Pulsado 50%	0.2 W/cm ²	+	+	-
	0.4 W/cm ²	+	+	+
	0.6 W/cm ²	+	+	+
	0.8 W/cm ²	+	+	+
	1.0 W/cm ²	+	+	+

Legenda: (+) Transmissibilidade observada; (-) Transmissibilidade não observada.

5.2.2 Avaliação Quantitativa

Seguem abaixo os resultados encontrados para a análise quanto ao potencial de transmissibilidade do gel de *C. duckei* 10% utilizado como meio de acoplamento. Sendo que para isso, este foi testado com o US nos modos contínuo, pulsado 20% e pulsado 50%. E seus resultados foram comparados com os valores obtidos na análise realizada com a água destilada e o gel carbopol utilizando-os também como meios de acoplamento.

Na tabela abaixo (Tabela 3) são apresentados os resultados encontrados na análise utilizando o US contínuo, nas intensidades de interesse 0.2/0.4/0.6/0.8/1.0 W/cm². E esses resultados foram comparados aos resultados encontrados nos testes realizados utilizando-se a água destilada e o gel carbopol como meio de acoplamento.

Tabela 3 – Porcentuais de transmissibilidade em gramas, com média e desvio padrão, encontrados no gel de *C. duckei* 10% aplicado através do modo contínuo. Baseado no modelo proposto por Guirro *et al.* (1996).

US Contínuo	0.2 W/cm ²	0.4 W/cm ²	0.6 W/cm ²	0.8 W/cm ²	1.0 W/cm ²
Água destilada	0.07g ±0.02	0.17g ±0.02	0.35g ±0.02	0.51g ±0.04	0.60g ±0.03
Gel carbopol	0.12g ±0.02	0.22g ±0.02	0.35g ±0.02	0.48g ±0.02	0.58g ±0.01
Gel <i>C. duckei</i> 10%	0.08g ±0.04	0.12g ±0.04	0.15g ±0.05	0.18g ±0.06	0.23g ±0.07

Na análise com gel carbopol contínuo, além dos valores captados pela balança foi possível observar uma vibração na superfície da água destilada contida no interior do *backer* utilizado no sistema de análise.

Segundo a classificação proposta por Guirro *et al.* (1996), para ser considerado um “Bom transmissor” de ondas ultrassônicas o gel de *C. duckei* 10% precisaria atingir valores de pelo menos 80% dos valores encontrados com a água destilada. Para ser considerado um “Transmissor moderado” este precisaria atingir valores entre 40 e 79% e para valores abaixo de 40% este seria considerado um “Transmissor pobre”.

No figura 17 estão apresentados os resultados obtidos em percentual de transmissibilidade do gel de *C. duckei* 10%, em comparação com a água destilada e o gel carbopol, no modo contínuo, nas intensidades selecionadas de 0.2/0.4/0.6/0.8/1.0 W/cm².

Podemos observar através dos dados obtidos que na intensidade de 0.2W/cm² o gel de copaiba foi considerado um “Bom transmissor”. Na intensidade de 0.4 W/cm² e 0.6W/cm² este foi considerado um “Transmissor moderado” e nas intensidades de 0.8W/cm² e 1.0W/cm² este foi considerado um “Transmissor pobre”, tanto quando comparado a água destilada como quando comparado ao gel carbopol comercial. Assim, quando no modo contínuo podemos observar que os melhores resultados seriam obtidos com a utilização do US nas menores intensidades.

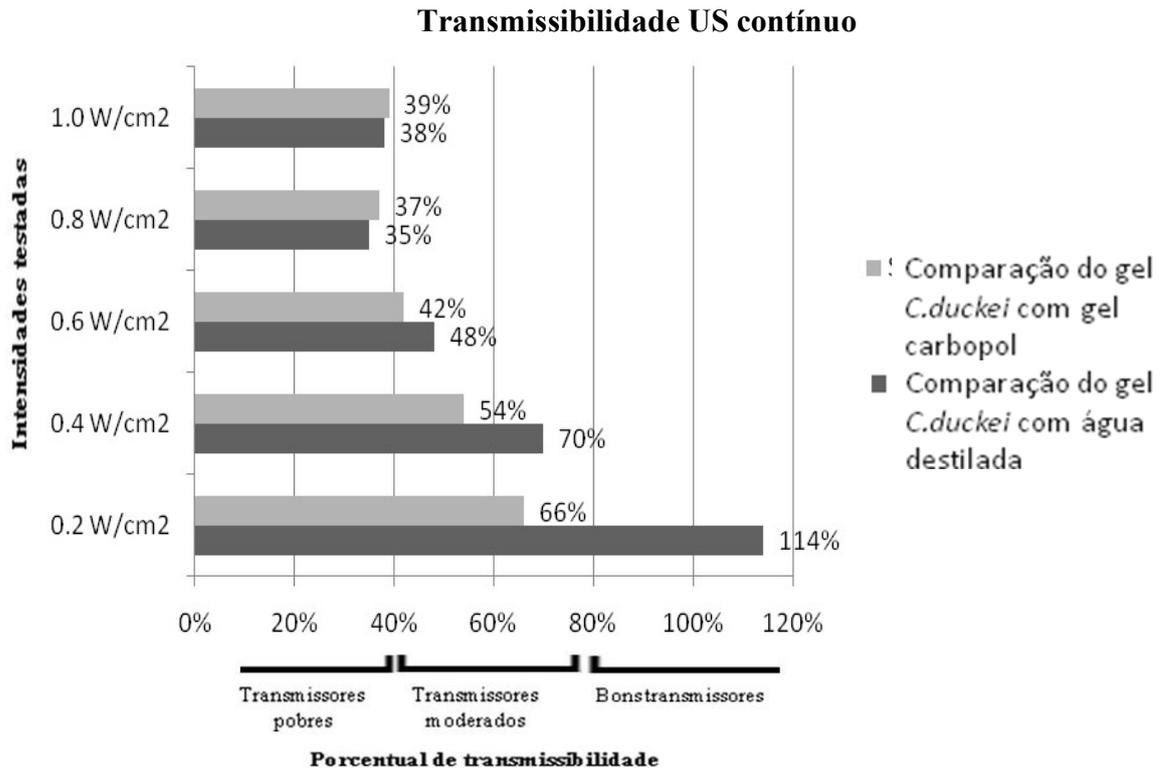


Figura 17 – Resultado do teste de transmissibilidade quantitativa do gel de *C. duckei* 10% com o US no modo contínuo em comparação aos valores obtidos com a água destilada e o gel carbopol. Análise através do sistema baseado no modelo proposto por Guirro *et al.* (1996).

Na análise realizada utilizando apenas a água destilada como meio de acoplamento e com o US no modo pulsado 20% (Tabela 4) não foram observadas medidas capturadas pela balança (índice=0.00g). No entanto, foi possível observar a formação de uma linha de transmissão das ondas de US entre o cabeçote e o cone (observável através da formação de bolhas entre estes), conforme ilustrado na figura 18. O mesmo foi observado na análise do gel carbopol no modo pulsado 20% em todas as intensidades. Quanto ao gel de *C. duckei* a 10% as medidas capturadas pela balança foram de valores negativos até a intensidade de 0.6 W/cm² e nas intensidades maiores de 0.8W/cm² e 1.0W/cm² estas apresentaram valores positivos.

Tabela 4 – Resultado do teste de transmissibilidade quantitativa (média e desvio padrão) do gel de *C. duckei* 10% com o US no modo pulsado 20%, sistema baseado no modelo proposto por Guirro *et al.* (1996).

US pulsado 20%	0.2 W/cm ²	0.4 W/cm ²	0.6 W/cm ²	0.8 W/cm ²	1.0 W/cm ²
Água destilada	0	0	0	0	0
Gel Carbopol	0	0	0	0	0
Gel <i>C. duckei</i> 10%	- 0.04g±0.02	- 0.02g±0.01	- 0.02g ±0.01	0.02g ±0.01	0.03g ±0.01

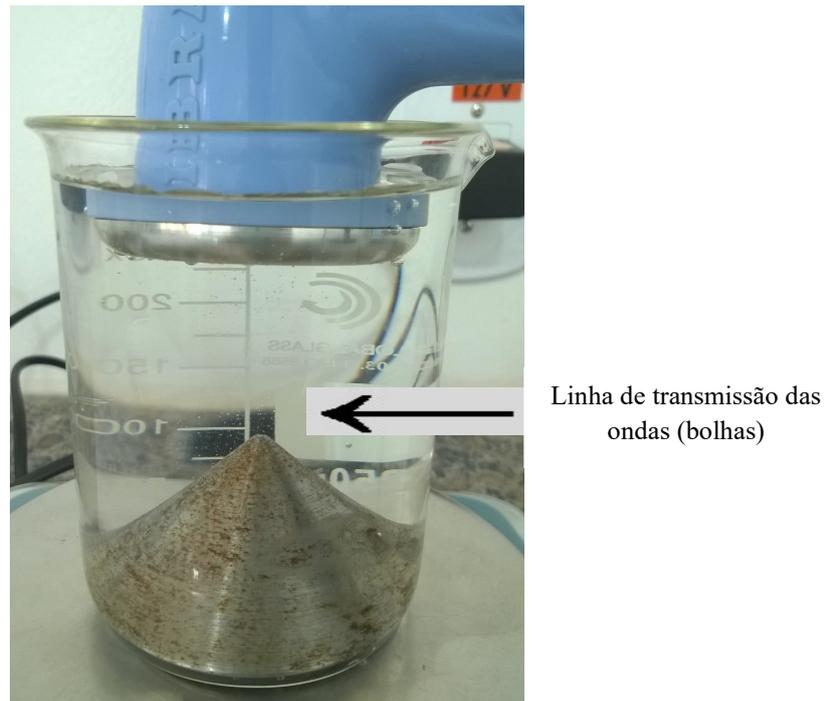


Figura 18 - Formação de uma linha de transmissão das ondas de US entre o cabeçote e o cone no teste com água destilada no modo pulsado 20% e 50%.

Foto: Daliane Marinho.

Na modalidade de US pulsado 20% apenas o gel de *C. duckei* 10% apresentou transmissibilidade positiva, não promovendo atenuação das ondas de US e tendo os esperados efeitos terapêuticos da fonoforese.

Na análise realizada com água destilada utilizando o US pulsado 50% (Tabela 5) não foram registrados valores no visor da balança em todas as intensidades testadas quando utilizada a água destilada como meio transmissor. Quando utilizado gel carbopol apenas na intensidade de $0.2\text{W}/\text{cm}^2$ a balança não registrou valores no visor da balança. Já quando foi utilizado o gel de *C. duckei* 10% foram encontrados valores positivos para todas as intensidades testadas. Assim, não foi possível realizar comparação entre os valores obtidos com o gel de *C. duckei* 10% e a água destilada, apenas com o gel carbopol, contrariando o recomendado nas pesquisas de Cameron e Monroe (1992), Guirro *et al.* (1996), Brasileiro, Alves e Escóssia (2003), Cárnio (2006).

Tabela 5 – Resultado do teste de transmissibilidade quantitativa (média e desvio padrão) do gel de *C. duckei* 10% com o US no modo pulsado 50%. Sistema baseado no modelo proposto por Guirro *et al.* (1996).

US pulsado 50%	0.2 W/cm ²	0.4 W/cm ²	0.6 W/cm ²	0.8 W/cm ²	1.0 W/cm ²
Água destilada	0	0	0	0	0
Gel Carbopol	0.00	0.08g ±0.01	0.11g ±0.02	0.14g ±0.02	0.18g ±0.03
Gel <i>C. duckei</i> 10%	0.02g ±0.01	0.02g ±0.01	0.06g ±0.02	0.07g ±0.03	0.09g ±0.03

No figura 19 estão apresentados os resultados obtidos em porcentual de transmissibilidade do gel de *C. duckei* 10%, modo pulsado 50%, apenas em comparação com o gel carbopol, uma vez que não foram obtidos valores no teste com a água destilada. E também apenas nas intensidades de 0.4/0.6/0.8/1.0 W/cm², pois na intensidade 0.2 W/cm² também não foi obtido nenhum valor no *display* da balança digital.

Podemos observar através dos dados obtidos que na intensidade de 0.6 W/cm², 0.8 W/cm² e 1.0 W/cm², o gel de copaiba foi considerado um “Transmissor moderado” e na intensidade de 0.4W/cm² este foi considerado um “Transmissor pobre”, isso quando comparado ao gel carbopol comercial. Assim, quando no modo pulsado 50% os melhores resultados seriam obtidos com a utilização do US nas intensidades acima de 0,6W/cm².

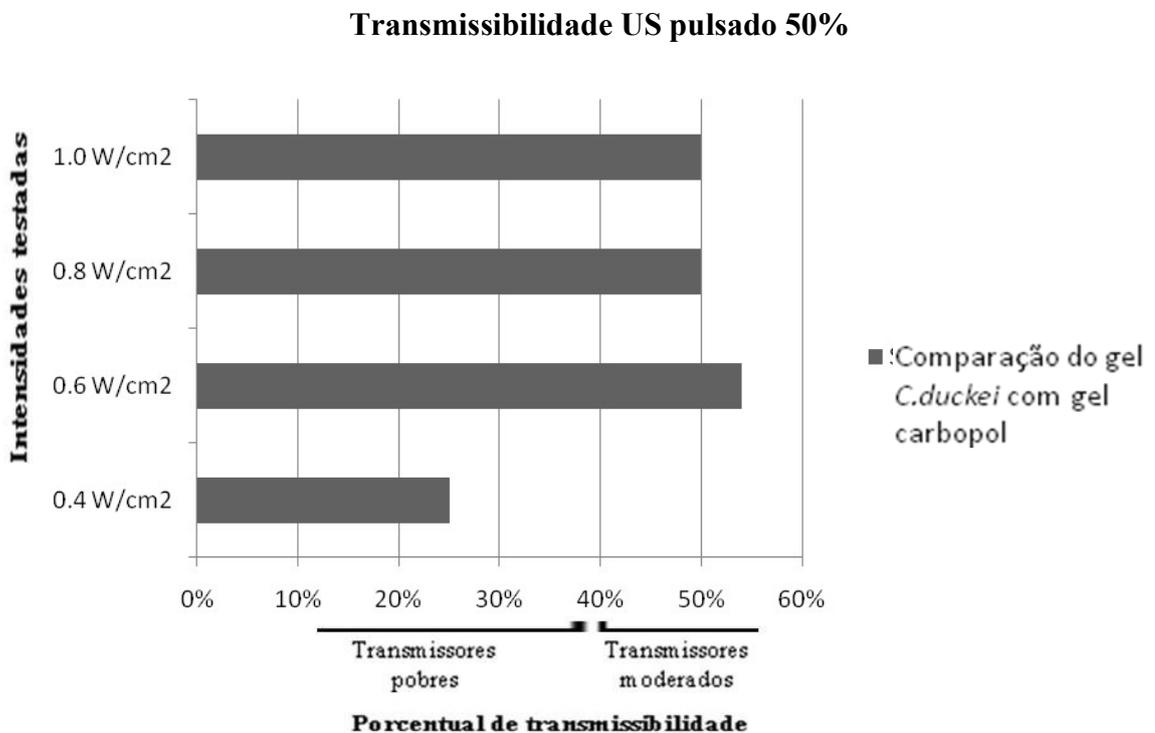


Figura 19 – Resultado porcentual em relação ao gel carbopol da transmissibilidade quantitativa do gel de *C. duckei* 10% com o US no modo pulsado 50%. Análise através do sistema baseado no modelo proposto por Guirro *et al.* (1996).

Segundo pesquisa realizada por Warren *et al.* (1976) as formulação em gel testadas se apresentaram como bons condutores de ondas ultrassônicas quando comparadas com outros meios acopladores a base de creme e de hidrocortisona, que atenuaram as ondas de ultrassom. O que podemos comprovar nessa pesquisa onde os melhores resultados foram encontrados nos testes realizados com gel e os piores resultados apenas com a água destilada, sobretudo na modalidade US pulsado 20%.

Outro estudo realizado por Balmaseda *et al.* (1986) concluíram que a água não pode ser considerada um bom condutor, pois esta, juntamente com o óleo mineral apresentaram um alto grau de atenuação e de impedância das ondas ultrassônicas. Já a formulação em gel apresentou-se com baixo grau de atenuação e de impedância. Sendo a mais indicada para o uso em fonoforese, corroborando os resultados encontrados nessa pesquisa.

Podemos ainda afirmar que os melhores resultados de transmissibilidade das ondas ultrassônicas foram obtidos com a utilização do US no modo contínuo devido a maior otimização do tempo de contato da substância com o tecido, a fim de garantir os maiores efeitos da cavitação ultrassônica. Sendo que a escolha do modo pode ser decisiva para a qualidade da deposição da droga pretendida, no caso dessa pesquisa os ativos de OR de *C. duckei*. No entanto, na prática clínica é comum o uso no modo pulsado a fim de associar a técnica ao processo de reparação tecidual evitando os efeitos adversos do uso do US na fase inflamatória do processo de reparação do tecido lesado, conforme abordado na pesquisa de Parizotto *et al.* (2003).

Uma das grandes dificuldades na administração do OR de *C. duckei* diz respeito à permeação do mesmo. Estudos quanto à permeação do OR de *C. duckei* não foram encontrados na literatura. No entanto, Lucca *et al.* (2015) concluíram em sua pesquisa sobre a permeação de β -cariofileno presente no OR de *Copaifera multijuga* Hayne que a permeação da nanoemulsão de óleo de copaiba apresentou uma melhor penetração na pele em comparação com o óleo *in natura*, pois tal formulação atingiu a derme, uma camada mais profunda. Assim, podemos observar que a forma *in natura* comumente utilizada pelas populações tradicionais não se apresenta como a mais eficiente para promover a permeação do OR de copaiba, sendo indicada a sua administração tópica utilizando meios de permeação.

Lucca (2013) em testes realizados com OR de *Copaifera multijuga* Hayne concluíram que o hidrogel de carbopol demonstrou ser o melhor agente geleificante para a nanoemulsão de copaiba. Isso foi atribuído a estabilidade que apresentou na formulação, possibilitando o

aumento da penetração do *β -cariofileno* pela pele, em especial na derme, devido ser a camada de interesse no tratamento da inflamação pela via tópica. O que corrobora os resultados encontrados nessa pesquisa através da escolha do gel como meio de veiculação do OR.

5.3 DETERMINAÇÃO DO pH DO OR E DO GEL DE OR DE *C.duckei*

O OR puro de *C.duckei*, assim como os géis manipulados a partir dele para os experimentos de toxicidade dérmica e para o teste de aplicabilidade terapêutica foram analisados quanto ao seu índice de acidez. Os valores obtidos foram comparados em relação ao índice do gel carbopol comercial classificado como neutro e da água destilada, também neutra, conforme valores apresentados a seguir (Tabela 6).

Tabela 6 – pH dos géis de *C.duckei* utilizados na pesquisa, com valores médios e desvio padrão.

pH substância	Água destilada	Gel carbopol	OR puro	Gel 75% OR	Gel 50% OR	Gel 25% OR
Média	6,92 ±0,02*	6,89±0,02 ^A	5,17±0,02* ^a	5,19±0,02* ^a	5,09±0,01* ^a	4,49±0,01* ^a

* Nível de significância <0,05% entre água destilada e outras substâncias.

^{A,a} Nível de significância <0,05% entre gel carbopol e outras substâncias.

A partir dos resultados encontrados foi possível observar que o pH de todos os géis apresentaram um pH levemente ácido. Havendo significância entre todas as substâncias contendo OR de *C.duckei* tanto em relação à água destilada, quanto em relação ao gel carbopol.

O pH da superfície da pele é ligeiramente ácido, este fica em torno de 4,2 a 5,6 (CLARK, 1996). E para que uma substância seja destinada ao uso tópico esta deve possuir um pH aproximado ao da pele, a fim de evitar alterações fisiológicas e estruturais que possam comprometer sua integridade (TAYLOR *et al.*, 1990). Podemos analisar que diante dos valores de pH obtidos para as formulações em gel de OR de *C.duckei* em estudo, todas estas apresentaram-se como adequadas e seguras para o uso tópico, uma vez que possuíam pH semelhantes ao da pele.

5.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA PELE

A análise histológica da pele foi realizada para avaliação comparativa quanto à capacidade dos géis utilizados na terapia com US de promover a abertura do estrato córneo da pele e assim permitir a veiculação dos ativos do OR de *C. duckei*.

Foi possível observar que no grupo onde foi utilizado o gel de OR de *C. duckei* 10% de forma tópica houve uma maior abertura do estrato córneo da pele, em micrômetros, o que indicaria uma maior possibilidade de absorção dos ativos farmacológicos da copaíba, quando comparado aos resultados do grupo controle, seguido do gel carbopol e o pior resultado foi encontrado no grupo fonoforese. Talvez devido à maior fricção e o leve aquecimento do cabeçote durante a aplicação promover ressecamento associado ao fato da base do gel ser aquosa. Apesar dessas diferenças perceptíveis através das médias dos grupos não houve significância estatística entre os resultados encontrados entre os grupos testados (Figura 20).

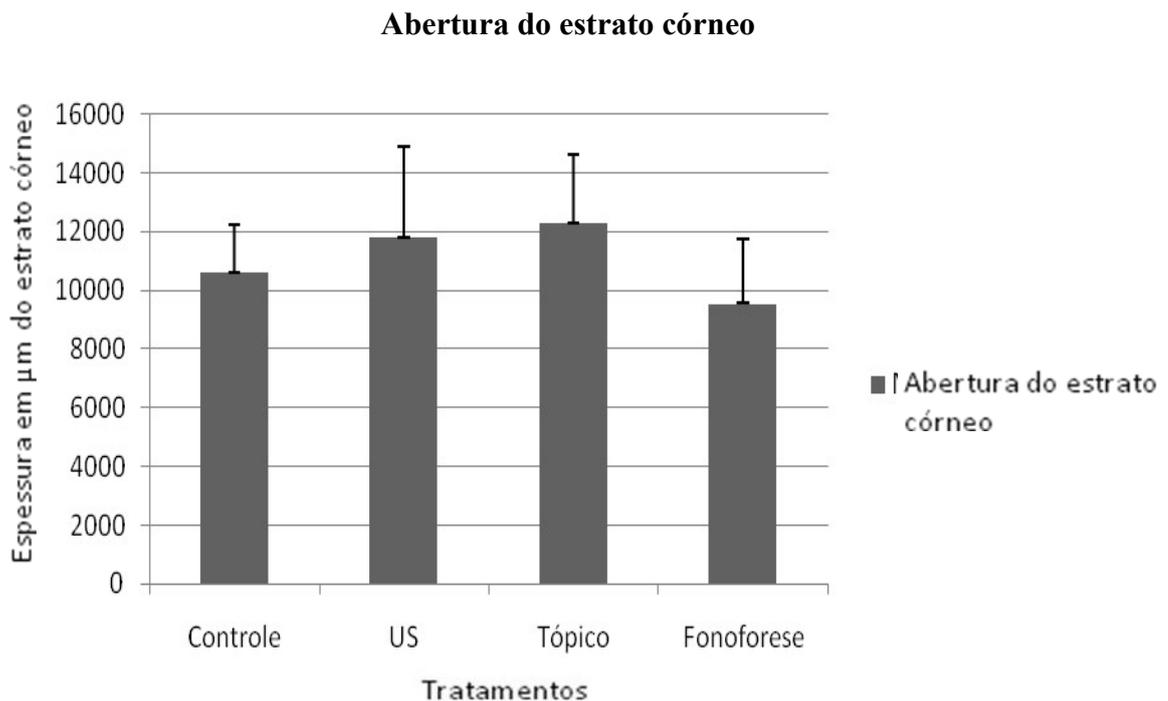


Figura 20 – Resultados da avaliação com média e desvio padrão, quanto à capacidade de abertura do estrato córneo da pele do gel de *C. duckei* 10% em comparação com outros grupos de tratamento.

Para que uma substância seja utilizada de forma tópica essa precisa ser capaz de difundir-se pelo estrato córneo e demais camadas da epiderme e assim poder chegar as

camadas mais profundas desta. Sendo assim, a escolha do veículo de administração precisa ser adequada e o veículo capaz de realizar a abertura do estrato córneo da pele, considerado a principal barreira a permeação de substâncias pela via tópica. Os promotores de permeação devem ser substâncias capazes de interagir com os constituintes do estrato córneo, diminuindo a resistência da pele a difusão do fármaco (BARRY, 1987).

O propilenoglicol é uma das substâncias capazes de modificar a permeabilidade da pele e assim promover a entrada da substância desejada, agindo como promotor de permeação através do estrato córneo da pele. Uma vez que este solubiliza a queratina do estrato córneo através da ocupação dos seus locais de ligação com o hidrogênio. E este é um dos constituintes do gel de *C. duckei* utilizado na pesquisa, e mais utilizado associado ao US terapêutico, o que garantiu a permeabilidade do OR manipulado e utilizado nesta pesquisa (HADGRAFT, 1999).

Os terpenos e terpenóides presentes nos óleos essenciais, dentre eles o OR de *C. duckei*, na sua porção volátil, são considerados importantes promotores de permeação utilizados na liberação de fármacos transdérmicos, isso devido a sua estrutura química consistir em repetidos grupos isopreno (C_5H_8) (MATSUDA, ARIMA, 1999).

Dessa forma podemos considerar que, com base nos resultados positivos na abertura do estrato córneo obtidos e que devido a ação combinada do propilenoglicol presente no gel base utilizado como veículo e meio de contato para aplicação do US, bem como devido a ação promotora conhecida dos terpenos e terpenóides presentes no OR de *C. duckei* que, o gel de OR testado foi capaz de promover a modificação desse estrato córneo a fim de permitir a eliminação dessa barreira a permeação dos ativos farmacológicos presentes no gel fitoterápico testado.

No entanto, atribui-se a falta de diferença significativamente considerável entre os grupos se deve ao fato de que o propilenoglicol estava presente em todas as formulações testadas. E em relação ao grupo controle talvez se deva ao tratamento histológico de diafanização das amostras de pele, que pode ter modificado a disposição do estrato córneo, mesmo após sua fixação em *bouin*, inclusive de todos os grupos, levando a resultados não conclusivos que necessitam de ajustes da metodologia conhecida.

Além das propriedades necessárias ao fármaco tópico serem determinantes para permeação, quando este é associado ao US terapêutico o efeito pode ser potencializado. Isso ocorre devido ao fenômeno da cavitação. Tal fenômeno é causado pela aplicação das ondas de

US sobre a pele, que resulta na formação de microbolhas gasosas no estrato córneo que ao romper-se violentamente permitem a passagem da droga ao promover uma desorganização transitória da região lipídica da camada córnea, aumentando assim a sua permeabilidade (KOEKE; PARIZOTTO, 2005).

Além do fenômeno de cavitação, segundo Byl (1995), o aquecimento produzido pelo ultra-som promove o aumento da circulação local, o que dilata os óstios dos folículos pilosebáceos e os orifícios das glândulas sudoríparas e permite que as moléculas difundam-se pelo estrato córneo até a rede capilar da derme. Além disso, também através do aumento da energia cinética das moléculas dos medicamentos como das proteínas, lipídeos e carboidratos da membrana celular as ondas de US seriam capazes de possibilitar a permeação das substâncias de forma transdérmica através do estrato córneo.

Apesar dos resultados encontrados podemos afirmar que são necessários estudos adicionais, principalmente de permeação do gel de *C. duckei* 10% desenvolvido, para análise da melhor forma de permeação de fitoterápicos a base de copaíba. Uma vez que testes específicos de permeação não puderam ser realizados durante essa pesquisa devido ao seu alto custo de operacionalização.

5.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA PELO PROTOCOLO OCDE 404

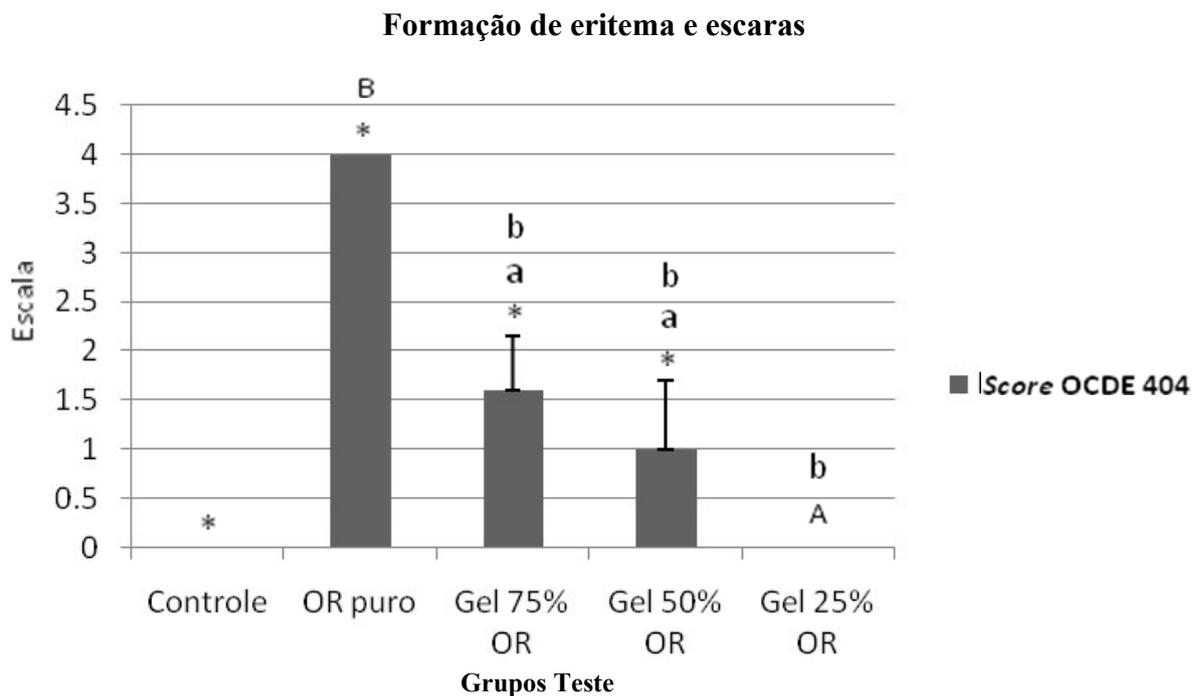
O protocolo OCDE 404 foi utilizado para verificar o grau de corrosão dérmica em uma única aplicação da forma *in natura* da copaíba e do gel de *C. duckei* nas proporções de OR: 75%, 50% e 25% sobre a pele. Em todas as concentrações e também na forma *in natura*, o OR de *C. duckei* não foi considerado agressivo para a pele, pois não provocou em uma única aplicação edema, irritação ou corrosão na pele dos animais.

Sendo assim, este foi considerado seguro para utilização sobre a pele quando utilizado apenas em uma única aplicação, conforme protocolo utilizado. O que justificou-se ainda mais após a análise do pH das substâncias testadas que apresentaram-se em valores semelhantes ao pH da pele, o que seria considerado adequado para substâncias de uso tópico. Não tendo assim potencial irritativo/corrosivo sobre a pele em apenas uma aplicação.

Este *score* de classificação foi também utilizado para analisar o grau de corrosão/irritação dérmica após 21 dias de aplicações consecutivas das substâncias sobre a pele, seguindo a metodologia do teste OCDE 410.

Foi possível observar grau de irritação leve sobre a pele apenas nas concentrações de gel OR 75% e gel OR 50% após 21 aplicações tópicas do gel em estudo. O que contra-indica o uso dessas substâncias sobre a pele por múltiplas aplicações (Figura 21).

Pode-se observar ainda que houve significância entre os resultados obtidos no grupo OR *in natura* em relação aos grupos Gel OR 75%, 50% e 25%. E quando comparados os resultados entre os grupos foi possível observar significância entre o gel OR 75% em relação ao gel OR 25% e entre o gel 50% em relação ao gel OR 25% (Figura 20).



* Houve significância <0,05% entre o grupo controle, o OR puro e os géis OR 75% e 50%.

A,a Nível de significância <0,05% entre gel OR 25% em relação aos géis OR 50% e 75%.

B, b Houve significância entre OR puro e outras substâncias testadas.

Figura 21 – Avaliação da irritação/corrosão dérmica (com média e desvio padrão) conforme critérios do protocolo OCDE 404 adaptado para o protocolo OCDE 410 (comparação dos resultados obtidos com grupo controle em relação aos resultados dos grupos com gel de OR nas concentrações de 75%, 50% e 25%).

Fernandes e Remor (2013) em sua pesquisa quanto a toxicidade dérmica aguda de *copaíba sp.* na sua forma *in natura* sobre a pele íntegra concluíram que esta pode ser classificada como um agente irritante grave, com *score* médio final de 2,81. Sendo que trabalhos que utilizaram metodologias parecidas, com as mesmas concentrações testadas e a espécie em estudo não foram encontrados na literatura.

5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA CUMULATIVA PELO PROTOCOLO OCDE 410

O protocolo OCDE 410 visa analisar a toxicidade dérmica após exposições cumulativas a determinada substância. Para esta pesquisa este foi adaptado e foram considerados como critérios de análise os parâmetros hematológicos, a necropsia e a avaliação da massa relativa de órgãos como rins e fígado.

Para este teste foram selecionadas as concentrações de *C. duckei* nas proporções de 75%, 50% e 25% manipuladas na forma de gel e aplicados por 21 dias consecutivos. Testes preliminares foram realizados com a copaíba *in natura* e foi observado que após quatro aplicações consecutivas e cumulativas esta causou irritação e corrosão dérmica. Sendo assim, essas três concentrações inferiores a 100% foram selecionadas para o teste de toxicidade dérmica por 21 dias consecutivos.

5.6.1 Exame dos órgãos internos e peso médio de fígado e rins

Através da necropsia nenhuma alteração visível de orifícios ou aumento de órgãos foi observada. Seguiu-se a realização da pesagem com verificação do peso médio dos órgãos fígado e rins em balança de precisão. Os valores dos pesos médios dos órgãos estão apresentados abaixo (Figura 22). Os maiores valores foram encontrados no grupo OR 50%, no entanto, essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa.

Quanto ao efeito da administração subcrônica do OR de *C. duckei* não foram encontradas pesquisas correlatas que utilizassem a aplicação em forma tópica. No entanto, na pesquisa de Rio (2001), após a administração oral e uso de creme vaginal com *C. duckei* por 30 dias consecutivos constatou-se alterações significativas nos pesos de fígado e rins.

Peso médio de fígado e rins

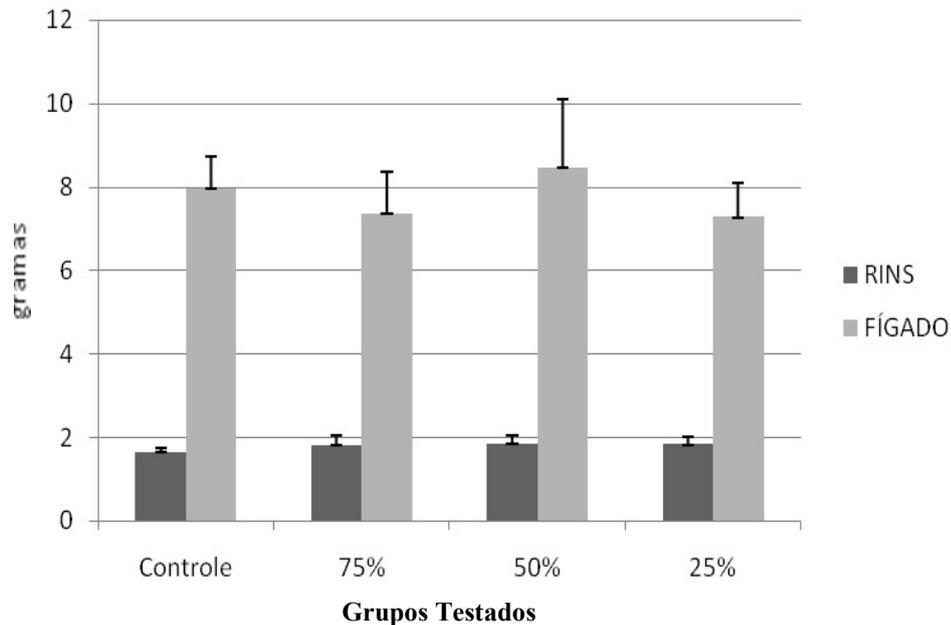


Figura 22 – Peso médio (em gramas) dos órgãos extraídos na autópsia conforme protocolo OCDE 410 após 21 dias de aplicações tópicas de gel com OR de *C.duckei* nas concentrações de 75%, 50% e 25%. Apresentados através de média com desvio padrão.

5.6.2 Análise de parâmetros hematológicos

Após o protocolo de doses cumulativas por 21 dias com as substâncias testadas seguiu-se a coleta de sangue para análise de células sanguíneas. Estas amostras foram posteriormente processadas no analisador hematológico *Mindray BC-200 Vet*. Segue abaixo os resultados obtidos por grupo teste em comparação com os parâmetros pré-estabelecidos pelo analisador hematológico (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores médios (\pm erro padrão da média) de variáveis sangüíneas e leucograma em fêmeas tratadas de forma tópica por 21 dias com gel fitoterápico de OR de *C.duckei* nas concentrações de 75%, 50% e 25% (Teste OCDE 410 de doses cumulativas) em comparação com os valores de normalidade estabelecidos pelo analisador hematológico *Mindray BC-2800 Vet*, para ratos e da literatura, Garcia e Navarro (2005).

Grupos para análise	Comparação entre parâmetros de células sanguíneas							
	Leucócito $\times 10^3/\mu\text{l}$	Linfócito $\times 10^3/\mu\text{l}$	Monócito $\times 10^3/\mu\text{l}$	Granulócito $\times 10^3/\mu\text{l}$	Hemácia $\times 10^3/\mu\text{l}$	Hemoglobina g/dl	Hematócrito %	Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{l}$
Parâmetros analisador <i>Mindray BC 2800 - Vet</i>	2.9 – 15.3	2.6 – 13.5	0.5	0.4 – 3.2	5.6 – 7.89	12 - 15	36 - 46	100 - 1610

Controle	13.3±0.8	5.7±1.2	0.9±0.6	5.9±1.2	7.4±0.4	14.7±0.8	46.7±0.3	1027.6±90.4
Gel OR 75%	7.8±1.3	5.5±0.7	0.3±0.2	2.5±0.3	8.6±0.4	16.2±0.8	51.2±1.4	1143.8±226.7
Gel OR 50%	13.7±1.2	10.7±1.3	0.8±0.7	3.3±1.1	8.6±0.5	16.8±1.0	50.7±1.0	1189.5±287.1

Quando analisados os resultados obtidos nos grupos de aplicação durante os 21 dias de aplicação nessa pesquisa foi possível observar que houve significância estatística entre o valor de leucócitos do grupo gel OR 75% e gel OR 25% em relação ao grupo controle. Entre o grupo controle e o grupo gel OR 50% em relação ao grupos controle de linfócitos. Entre o grupo gel OR 25% e o grupo controle de monócitos e entre todos os grupos gel testados em relação ao grupo controle quanto aos granulócitos (Tabela 8).

Foi possível observar ainda que houve significância estatística entre os grupos gel OR 75% e 50% em relação ao grupo controle de hemácias. E entre os grupos gel OR 75%, 50% e 25% em relação ao grupo controle dos valores de hematócrito e ainda entre os grupos gel OR 75%, 50% e 25% em relação ao grupo controle para hematócrito. Sendo que não houve significância estatística em relação as plaquetas (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores médios (\pm erro padrão da média) com significância das variáveis sanguíneas e leucograma em fêmeas tratadas de forma tópica por 21 dias com gel fitoterápico de OR de *C. duckei* nas concentrações de 75%, 50% e 25%.

Grupos para análise	Comparação entre parâmetros de células sanguíneas							
	Leucócito $\times 10^3/\mu\text{l}$	Linfócito $\times 10^3/\mu\text{l}$	Monócito $\times 10^3/\mu\text{l}$	Granulócito $\times 10^3/\mu\text{l}$	Hemácia $\times 10^3/\mu\text{l}$	Hemoglobina g/dl	Hematócrito %	Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{l}$
Controle	13.3±0.8	5.7±1.2	0.9±0.6	5.9±1.2	7.4±0.4	14.7±0.8	46.7±0.3	1027.6±90.4
Gel OR 75%	7.8±1.3*	5.5±0.7	0.3±0.2*	2.5±0.3*	8.6±0.4*	16.2±0.8*	51.5±1.0*	1143.8±226.7
Gel OR 50%	13.7±1.2	10.7±1.3*	0.8±0.7	3.3±1.1*	8.6±0.5*	16.8±1.0*	50.7±1.0*	1189.5±287.1
Gel OR 25%	6.5±1.2*	4.72±1.0	0.3±0,2*	1.5±0.6*	8.0±0.7	16.1±0.7*	50.4±1.2*	1184.8±73.8

Rio (2001) também constatou que não ocorreram alterações hematológicas significativas quanto ao efeito da administração subcrônica do OR de *C. duckei* após a administração oral e uso de creme vaginal com *C. duckei* por 30 dias consecutivos.

No entanto, Lima (2014) constatou que houveram alterações hematológicas significativas após a administração subcrônica por 22 dias consecutivos de creme vaginal com

OR de *C. duckei*, alterando os níveis de hemoglobina, hematócrito e linfócitos. Apesar disso, o mesmo não foi observado quando da utilização por via oral.

Pesquisas que analisassem a toxicidade após a aplicação dérmica de uma substância a base de *C. duckei* não foram encontradas na literatura.

5.7 AÇÃO TERAPÊUTICA DO GEL DE *C. duckei* 10%

Abaixo segue a apresentação dos resultados obtidos no teste de ação terapêutica com gel de *C. duckei* 10% em comparação quanto aos grupos e ainda em comparação aos diferentes momentos de eutanásia, que ocorreram 48h e no 7º dia após o trauma.

Os resultados estão dispostos de acordo com as variáveis de interesse pesquisadas separadamente entre elas e conjuntamente entre os momentos de eutanásia. Sendo que as variáveis de interesse para a pesquisa foram: fibrose, edema, necrose, células do infiltrado inflamatório e células com núcleo centralizado.

A) Fibrose: Comparação entre os grupos 48h e 7º dia.

Quanto à fibrose (Figura 23) esta foi analisada de acordo com a área em micrômetros (μm). Foi possível observar que no momento 48h após a lesão o grupo com maior área de fibrose foi o grupo US, seguido do grupo fonoforese e do grupo tópico, em relação ao grupo controle, que foi o com a menor área de fibrose observada. E já quando observamos o momento 7º dia, a terapia que menos apresentou área de fibrose foi o grupo US, seguido do grupo fonoforese e do grupo tópico.

Sendo assim, foi possível constatar que nas primeiras 48h após a lesão o mais indicado seria a utilização do tratamento com gel de *C. duckei* 10% de forma apenas tópica e após esse momento o mais indicado seria a utilização de US ou a fonoforese com o gel do OR para o controle do processo cicatricial. Mas, apesar dessas diferenças perceptíveis ao gráfico, quando comparados mediante teste de variância não houve significância estatística entre os grupos de tratamento, tanto 48h após o trauma como no 7º dia em relação ao grupo controle ou entre eles.

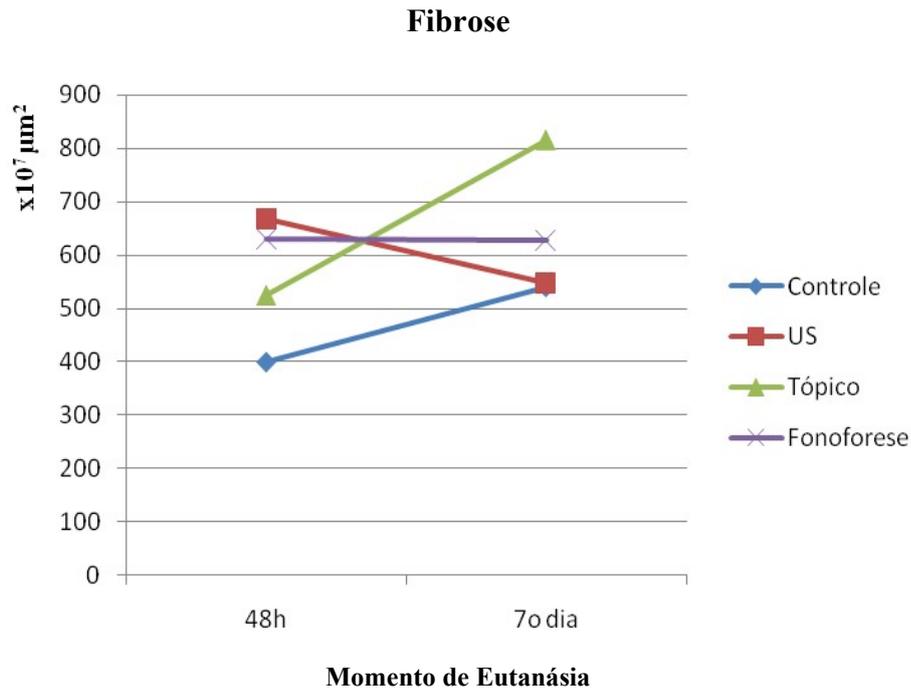
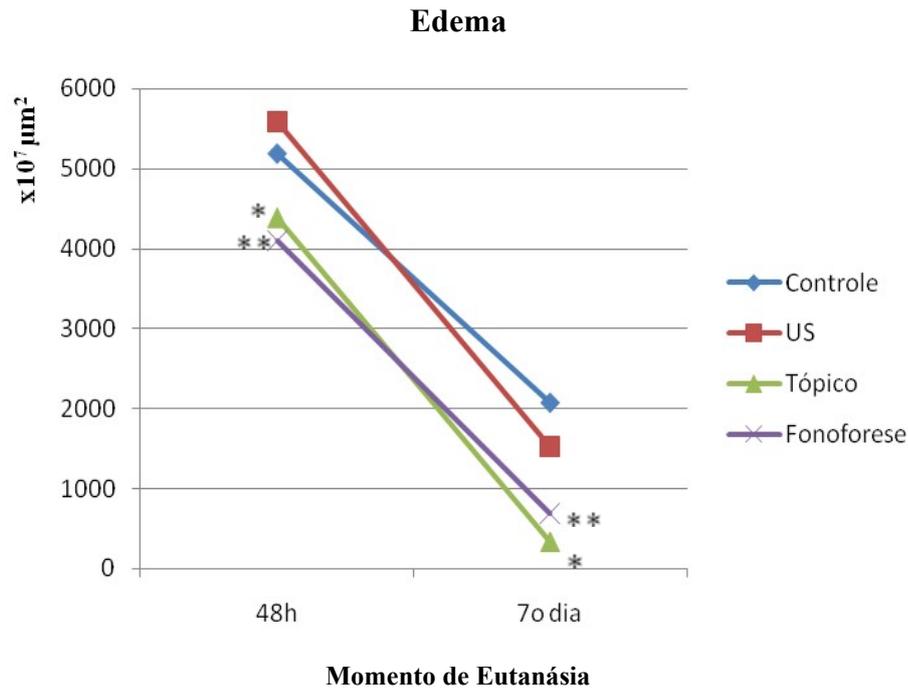


Figura 23 – Área de formação de fibrose (em μm) nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7º dia). Os resultados estão expressos em média, $n=5/\text{grupo}$.

B) Edema: Comparação entre os grupos 48h e 7º dia.

Em relação à variável edema (Figura 24) esta foi analisada de acordo com a área em micrômetros (μm). O tratamento que no momento 48h apresentava a menor área de edema foi à terapia por fonoforese, seguido da terapia por uso tópico e depois a terapia por US. Já no momento 7º dia a terapia que apresentava menor área de edema foi a de uso tópico, seguido do grupo fonoforese e do grupo US em relação ao grupo controle. No entanto, os resultados não apresentaram significância em relação ao grupo controle, nos dois momentos de eutanásia. No entanto, quando comparados entre si, houve significância entre o resultado dos grupos Tópico 48h e Tópico 7º dia. Bem como houve significância entre os grupos testados Fonoforese 48h e Fonoforese 7º dia.



* Houve significância entre as terapias por uso Tópico 48h e Tópico 7º dia quanto a formação da área de edema.

** Houve significância entre as terapias por Fonoforese 48h e fonoforese 7º dia quanto a formação da área de edema.

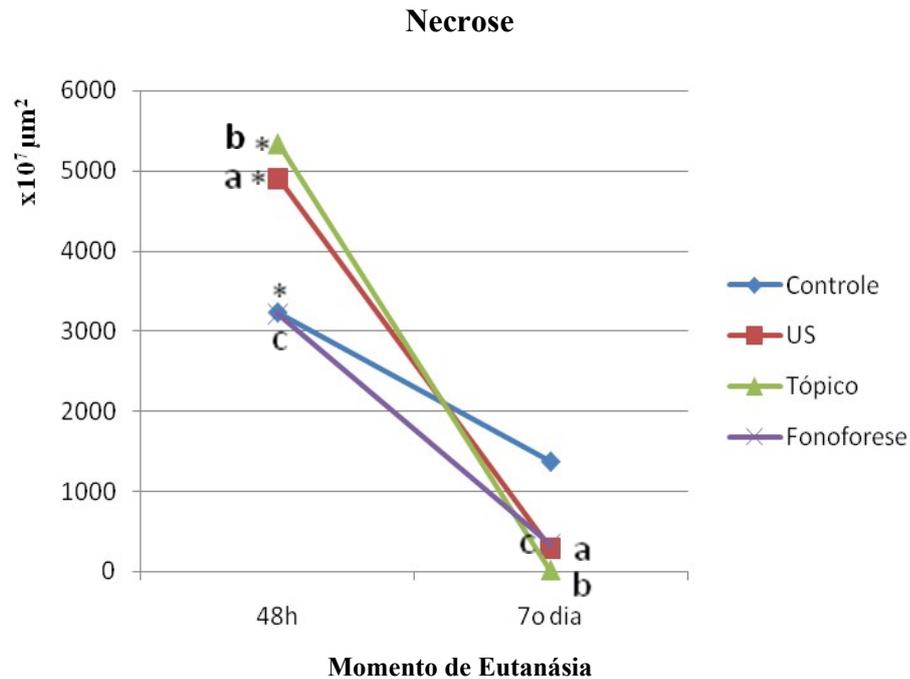
Figura 24 - Área de edema (em μm^2) nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7º dia). Os resultados estão expressos em média, $n=5/\text{grupo}$.

C) Necrose: Comparação entre os grupos 48h e 7º dia.

Em relação à formação de necrose (Figura 25) esta foi analisada de acordo com a área em micrômetros (μm). Sendo que no momento 48h a terapia onde houve a menor formação de áreas de necrose foi no grupo fonoforese, seguido pela terapia com US e em uso tópico. Sendo que, tanto a terapia por US como a por uso tópico tiveram resultados piores que o do grupo controle. Havendo significância entre os resultados das terapias com US e Tópico em relação ao grupo controle.

Em relação ao momento 7º dia a menor área de formação de áreas de necrose foi no grupo tópico, seguido da terapia por fonoforese e pela terapia de US, sendo que todas tiveram resultados melhores que do grupo controle. No entanto, não houve significância entre os tratamentos testados no momento 7º dia.

Quando comparados os resultados entre momentos diferentes de eutanásia, foi possível observar significância entre as terapias US 48h e US 7º dia e entre as terapias uso Tópico 48h e Tópico 7º dia, bem como nas terapias Fonoforese 48h e Fonoforese 7º dia.



* Houve significância entre as terapias por US 48h e Tópico 48h em relação ao grupo controle 48h.

^a Houve significância entre as terapias por US 48h e US 7º dia.

^b Houve significância entre as terapias por uso Tópico 48h e Tópico 7º dia.

^c Houve significância entre as terapias por Fonoforese 48h e Fonoforese 7º dia.

Figura 25 - Área de necrose (em μm^2) nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7º dia). Os resultados estão expressos em média, $n=5/\text{grupo}$.

D) Infiltrado inflamatório: Comparação entre os grupos 48h e 7º dia.

Quanto à intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido muscular analisado, este foi analisado de acordo como o número de células por campo (Figura 26). No momento 48h a terapia que se mostrou mais eficaz na redução/controle deste foi à terapia por fonoforese, apesar disso o número de celular/campo presente nesse grupo de terapia ainda foi superior aos valores encontrados no grupo controle. E esse padrão ainda foi observado nas terapias por uso tópico e fonoforese. Mas apesar das diferenças observadas ao gráfico, não houve significância entre os grupos testados no momento 48h.

No momento 7º dia a terapia que se mostrou mais eficaz no controle ao infiltrado inflamatório foi a por uso tópico em relação ao grupo controle. Já nas terapias por US e fonoforese os valores encontrados foram piores que o do grupo controle. Mas apesar disso não

houve significância estatística também nas terapias testadas no momento 7º dia, quando comparado ao grupo controle ou aos outros grupos teste.

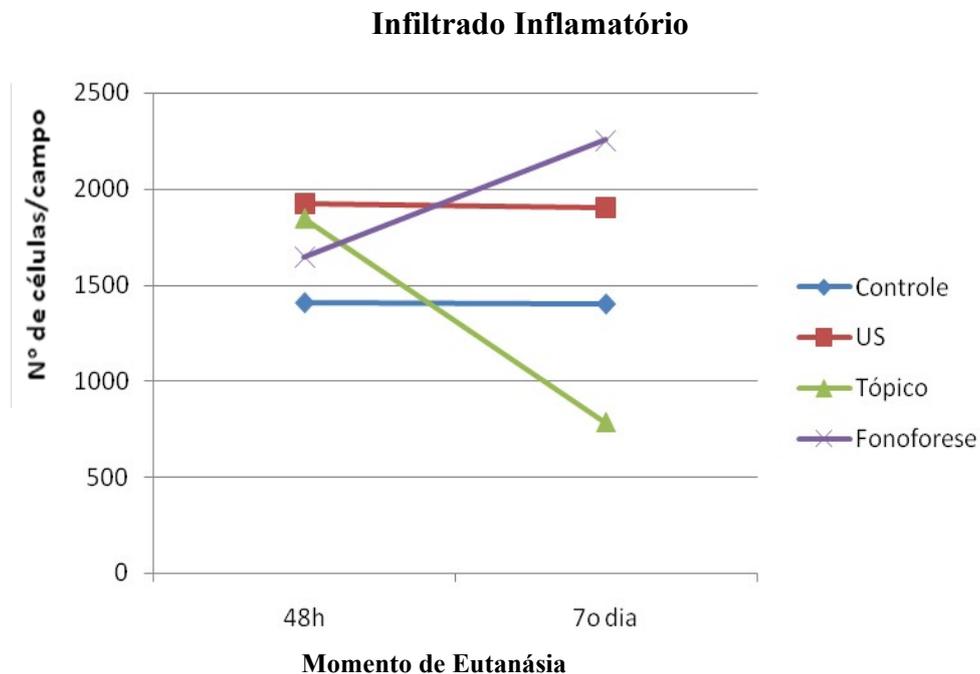


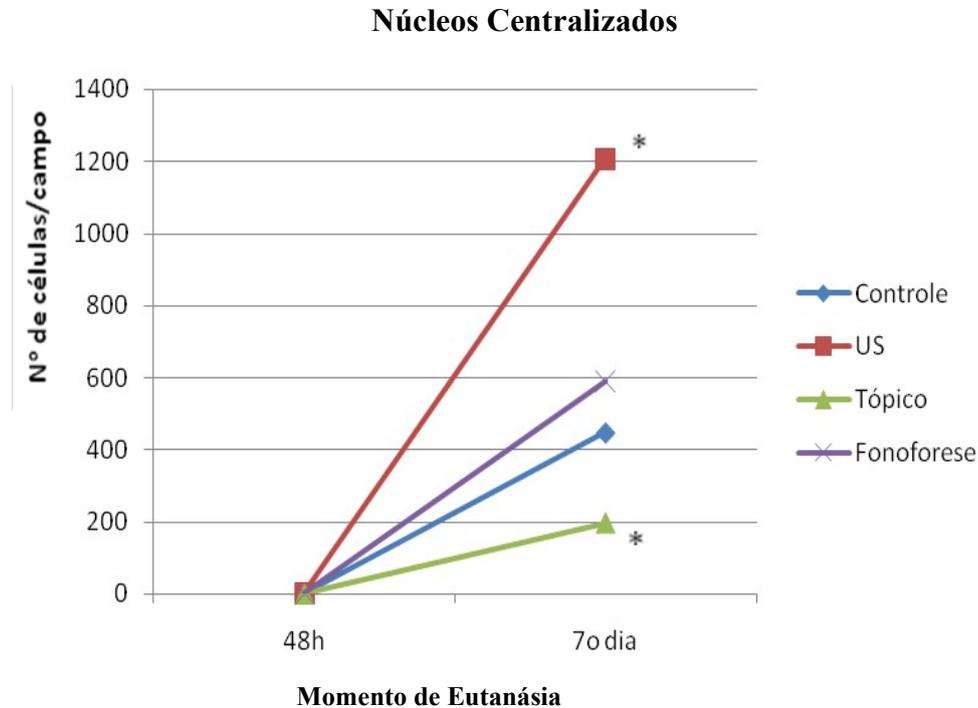
Figura 26 – Número de células/campo de células do infiltrado inflamatório nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7º dia). Os resultados estão expressos em média, n=5/grupo.

E) Núcleos centralizados: Comparação entre os grupos 7º dia.

Quanto ao número de células com núcleo centralizado presentes no tecido muscular analisado, este foi analisado de acordo com o número de células por campo. Este resultado demonstra o grau de formação de novo tecido muscular, com a presença de novas células que se apresentam com núcleos centralizados surgidas a partir das células satélites musculares, visto que as células musculares maduras possuem núcleos periféricos. E como já era esperado, essas células somente foram visualizadas no momento de análise 7º dia. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 27.

No momento 48h nenhuns dos grupos de terapias apresentaram núcleos centralizados/campo. Em relação ao momento 7º dia a terapia com o maior número de células com núcleo centralizado/campo foi à terapia por US, seguida das terapias por fonoforese e uso tópico. Sendo que o uso tópico apresentou valores de células/campo inferiores ao grupo controle. O que não ocorreu com as outras terapias testadas. Mas apesar disso não houve

significância entre as terapias testadas em relação ao grupo controle. Só foi observada significância entre as terapias US 7º dia e Tópico 7º dia.



* Houve significância na diferença entre as terapias US 7º dia e Tópico 7º dia.

Figura 27 - Número de células/campo de células com núcleos centralizados nos diferentes momentos de eutanásia (48h e 7º dia). Os resultados estão expressos em média, n=5/grupo.

Segue abaixo, na figura 28 um *ranking* das terapias utilizadas quanto aos critérios e momentos analisados. Utilizada como instrumento para resumir os resultados encontrados.

	Infiltrado Inflamatório		Edema		Necrose		Fibrose		Núcleos centralizados	
	48h	7º dia	48h	7º dia	48h	7º dia	48h	7º dia	48h	7º dia
1º	C	T	F	T	F	T	C	C	0	US
2º	F	C	T	F	C	F	T	US	0	F
3º	T	US	C	US	US	US	F	F	0	C
4º	US	F	US	C	T	C	US	T	0	T

Figura 28 - Quadro comparativo entre os diferentes grupos de tratamento quanto ao *ranking* de melhores resultados encontrado de acordo com os dias de tratamento para as variáveis estudadas. (C) Grupo controle; (T) Grupo tópico; (F) Grupo fonoforese; (US) Grupo ultrassom.

Por meio dessa tabela podemos visualizar que os melhores resultados para redução das variáveis estudadas foram encontrados nos grupos tópico e fonoforese. Exceto em relação à variável “núcleos centralizados”, onde o maior número de núcleos centralizados por campo foi encontrado no grupo US, o que já era esperado devido à propriedade das ondas de ultrassom de acelerar o processo inflamatório, o que leva a agilidade na resolução da inflamação e conseqüentemente maior agilidade na formação do novo tecido, que pode ser representado pela formação de novas células musculares, a partir da ativação das células satélites na periferia das fibras musculares (PERTILLE; MACEDO; OLIVEIRA, 2012).

Os resultados encontrados no grupo tópico também confirmam a eficiência do uso tópico tradicional sobre a pele da copaíba com mínima fricção ou “massagem”, o que comprova a sua eficiência na resolução do quadro inflamatório, já atribuída à copaíba. Podemos comprovar ainda que *C. duckei* permaneceu farmacologicamente eficiente quando da sua veiculação através da formulação em gel.

Os resultados positivos visualizados através da boa colocação no *ranking* do grupo fonoforese respondem positivamente ao questionamento quanto a sua eficiência farmacológica quando veiculado através do gel de OR de *C. duckei*. No entanto, quando comparamos ao efeito encontrado no grupo tópico, estes foram bem semelhantes, não havendo como o esperado, incremento do resultado pela soma dos efeitos terapêuticos já reconhecidos da copaíba e do US. Assim, isso não justificaria o uso de um equipamento quando apenas com o uso tópico seria possível obter os mesmos efeitos. Isso se justifique possivelmente a “competição” das propriedades anti-inflamatórias do OR e pró-inflamatórias do US (LEANDRO *et al.*, 2012; KOEKE *et al.*, 2005).

Não foram encontrados na literatura estudos que tenham testado a atividade antiinflamatória e de cicatrização muscular do OR de *C.duckei* através da técnica de fonoforese. No entanto, existem algumas pesquisas que já puderam comprovar os efeitos terapêuticos positivos de outras plantas medicinais através da técnica de fonoforese. Como exemplo, podemos citar os trabalhos realizados com arnica, andiroba, calêndula, aloe vera e até mesmo outras espécies de copaíba, como a *C.reticulata* e *C.langsdorff*. E trabalhos que avaliaram e comprovaram efeitos positivos na aplicação por fonoforese de fármacos como hidrocortizona, diclofenaco dietilamônio e dimetilsulfóxido (DMSO). No entanto, por meio de metodologias de aplicação e análise diferentes, apesar algumas serem bem semelhantes. Como podemos visualizar nas pesquisas citadas em seguida.

Alfredo *et al.* (2009) analisaram os efeitos da fonoforese associados com *Arnica montana* sobre a fase aguda de uma lesão muscular inflamatória após lesão cirúrgica do músculo tibial anterior. Este estudo utilizou também o US no modo pulsado 20% e realizou análise histológica, com a diferença de que a análise foi qualitativa e realizou o tratamento apenas por três dias. Nesta pesquisa não foi encontrada diferença significativa entre os grupos US e US associado à arnica. Separadamente, apenas a massagem com gel de arnica provou ter eficiência antiinflamatória na lesão muscular aguda em uso tópico. No entanto, os mesmos resultados não foram obtidos com a associação da Arnica Montana a fonoforese. Isso se deve provavelmente ao fato de que o US tenha minimizado a atividade antiinflamatória da Arnica Montana. Resultados parecidos foram encontrados nesta pesquisa em relação ao grupo tópico, apesar das diferenças existentes na metodologia utilizada.

Brito *et al.* (2006) analisaram a utilização por fonoforese de *Carapas guianensis* (andiroba), *Copaifera officinalis* e diclofenaco dietilamônio. Sendo que em seus resultados não foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos estudados. Sendo que Brito e colaboradores não deixaram claro ou descreveram a forma de veiculação das substâncias testadas, se em creme, gel, extrato ou na forma pura. E utilizou a indução da miosite pela aplicação de ácido acético no local. Nesta pesquisa foi realizada a avaliação das mesmas variáveis de interesse (necrose, fibrose, edema e infiltrado inflamatório), no entanto, de forma qualitativa, através do registro da presença ou ausência das variáveis. Tais diferenças nos fazem questionar a comparação dos resultados da pesquisa de Brito e colaboradores com os encontrados na presente pesquisa.

Ricoldy *et al.* (2010) analisaram o efeito terapêutico de um gel extraído da *Calendula officinalis* aplicado através da técnica de fonoforese. Este estudo conclui que a fonoforese se apresentou como a mais indicada no tratamento de lesões musculares. Sendo que em seus resultados observou diferenças significantes entre os grupos tratados por fonoforese e gel de calêndula em relação ao grupo controle na resolução de lesões musculares. Isso, pois estes grupos apresentaram maior quantidade de fibroblastos, mioblastos e de neovascularização, bem como redução da área de lesão. Este estudo utilizou uma metodologia de aplicação semelhante a esta pesquisa, com exceção do mecanismo de lesão que foi por meio de uma incisão cirúrgica e quanto as variáveis analisadas.

Maia Filho *et al.* (2010) compararam o uso tópico do gel de aloe vera, ultra-som modo pulsado e aloe vera associado a fonoforese em pata de rato com tendinite induzida por colagenase. O resultado desse estudo indicou que aloe vera associado à fonoforese foi uma técnica promissora para o tratamento de tendinite, pois reduziu de forma significativa o edema na região e na análise histológica reduziu de forma superior a outros grupos a área de infiltrado inflamatório e proporcionou melhor disposição de fibras colágena. Esta pesquisa comprovou assim os benefícios esperados da fonoforese associada a um fitoterápico, mas apesar desses efeitos comprovadamente eficientes no processo de reparo, a pesquisa não analisou a repercussão sobre o músculo.

Koeke *et al.* (2005) realizaram um estudo comparativo da eficácia da aplicação tópica por fonoforese da hidrocortizona 10% na reparação de tendão calcâneo. Este estudo concluiu que o tratamento por fonoforese foi o mais eficiente na recuperação da lesão tendinosa. Comprovando o incremento da ação da droga através da via de aplicação transdérmica. Apesar de ter sido realizado o experimento sobre a ação da fonoforese sobre tecido tendinoso, podemos atribuir que este resultado por analogia corrobora os resultados positivos encontrados na presente pesquisa, apesar das diferenças metodológicas entre estas.

Silveira *et al.* (2010) analisaram o uso de um gel de Dimetilsulfóxido (DMSO) no processo de reparação de uma lesão muscular através de seu uso por fonoforese e constataram que tal associação proporcionou um incremento do processo de recuperação, com a redução da lesão muscular e do estresse oxidativo. Comprovando assim os benefícios da técnica de fonoforese.

Carvalho *et al.* (2005) em seus resultados concluíram que podem ser atribuídas ao OR de *C. duckei* as atividades antiinflamatória e analgésica tópica. Sendo que a atividade

analgésica foi determinada utilizando o método de teste de contorção abdominal e a maior redução do edema induzido por óleo de cróton. O que comprova os efeitos atribuídos a espécie de copaíba utilizada na presente pesquisa apesar de não podermos comparar os resultados através de análise histológica.

Segue abaixo os resultados com a apresentação das imagens das lâminas histológicas dos grupos testados (Figuras 29 a 40).

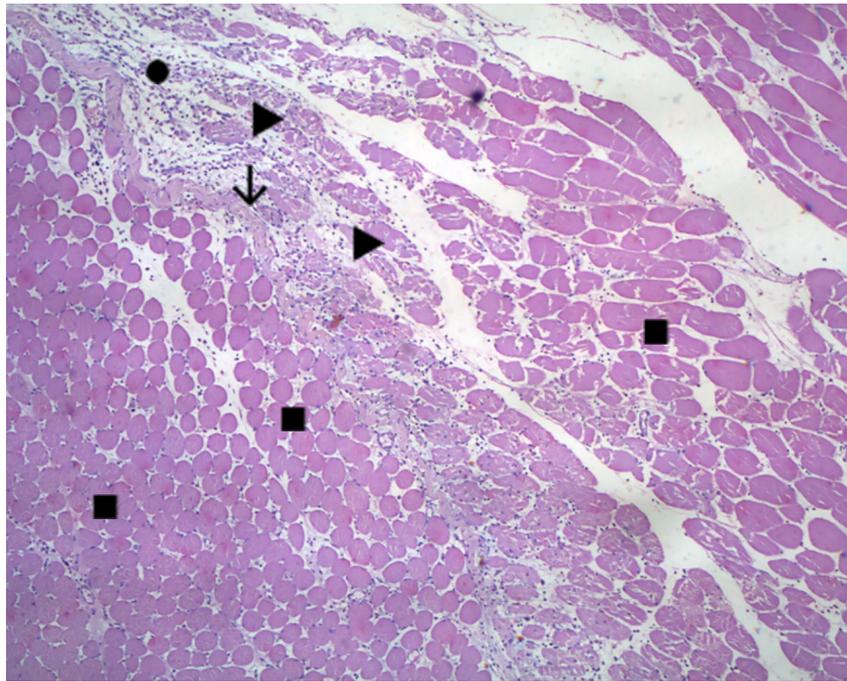


Figura 29 – Histologia do grupo controle 48h. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■); necrose (▶) e fibrose (↓). Aumento de 4x.

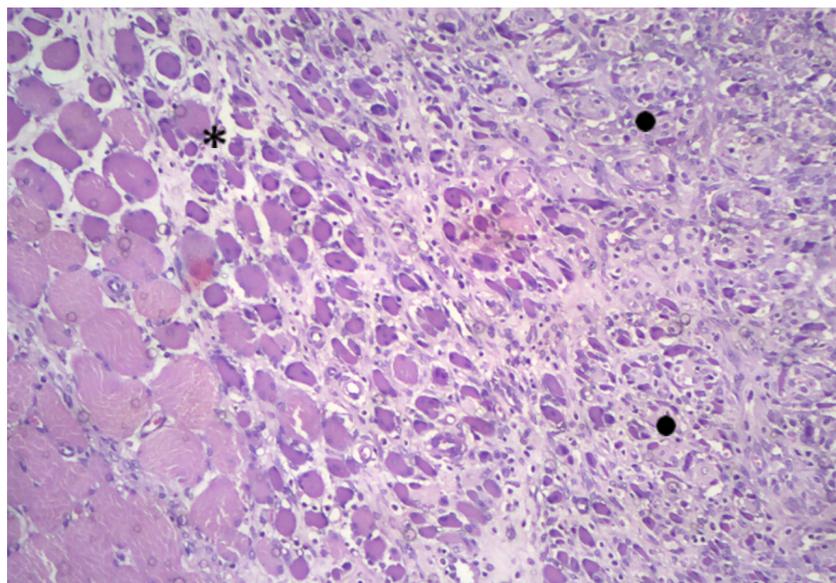


Figura 30 – Histologia do grupo controle 7º dia. Apresentando infiltrado inflamatório (●); núcleos centralizados (*). Aumento de 10x.

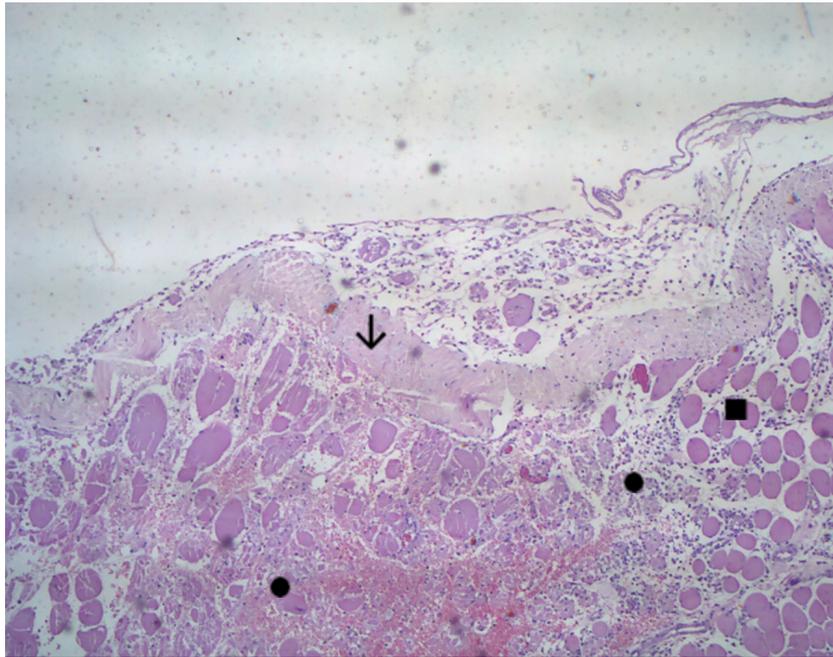


Figura 31 – Histologia do grupo US 48h. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■) e fibrose (↓). Aumento de 4x.

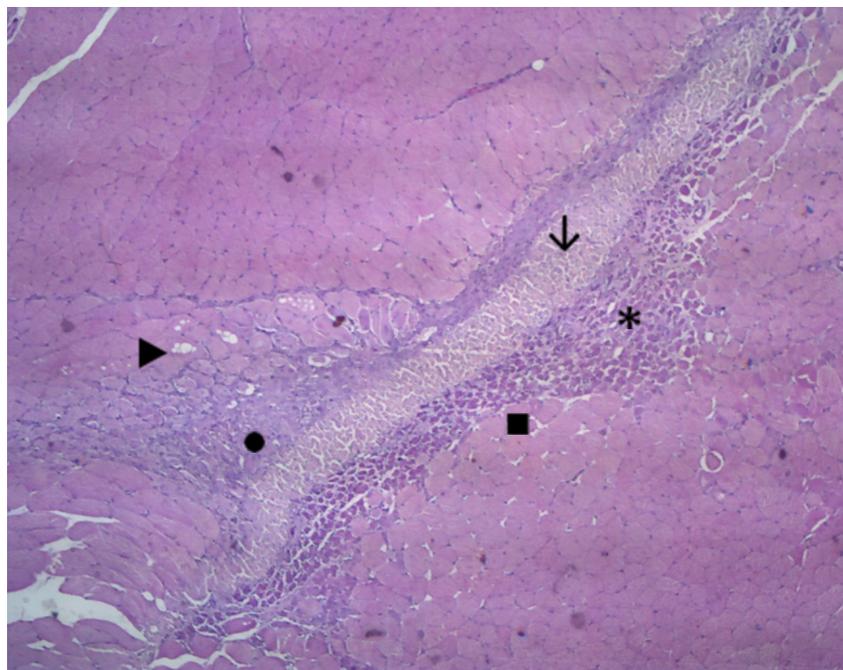


Figura 32 – Histologia do grupo US 7º dia. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■); necrose (▶); fibrose (↓) e células com núcleos centralizados (*). Aumento de 4x.

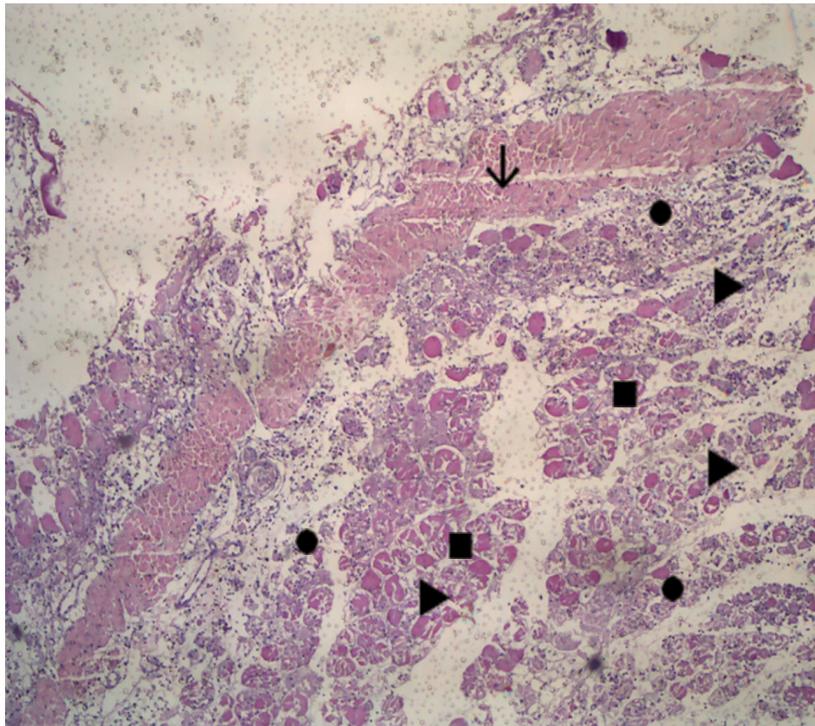


Figura 33 – Histologia do grupo tópico 48h. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■); necrose (▶) e fibrose (↓). Aumento de 4x.

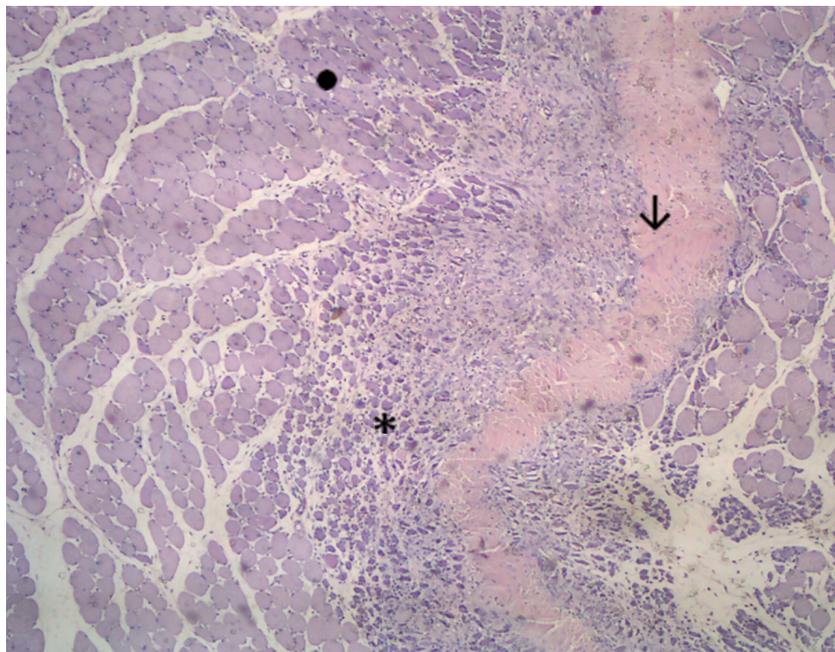


Figura 34 – Histologia do grupo tópico 7º dia. Apresentando infiltrado inflamatório (●); núcleos centralizados (*) e fibrose (↓). Aumento de 4x.

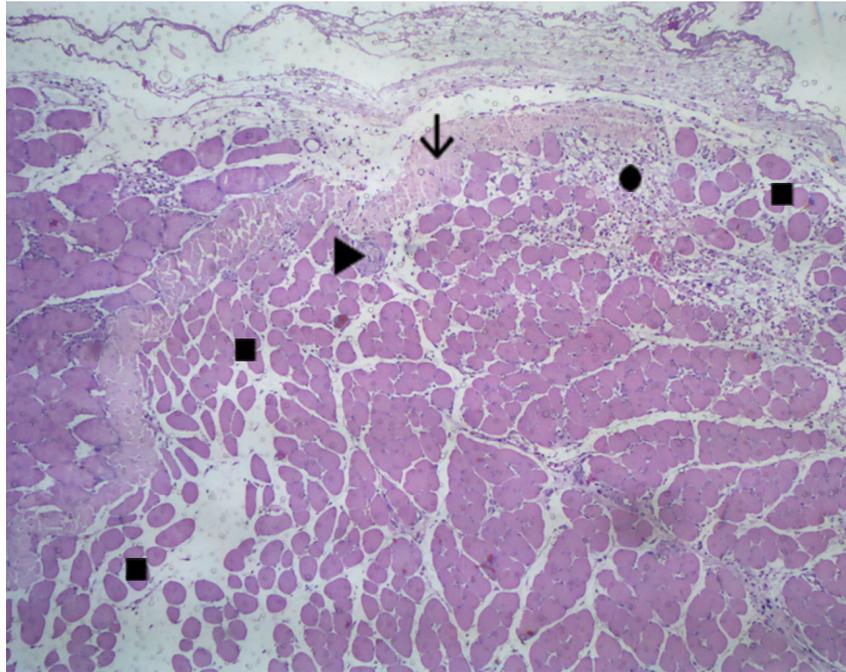


Figura 35 – Histologia do grupo fonoforese 48h. Apresentando infiltrado inflamatório (●); edema (■); necrose (▶) e fibrose (∇). Aumento de 4x.

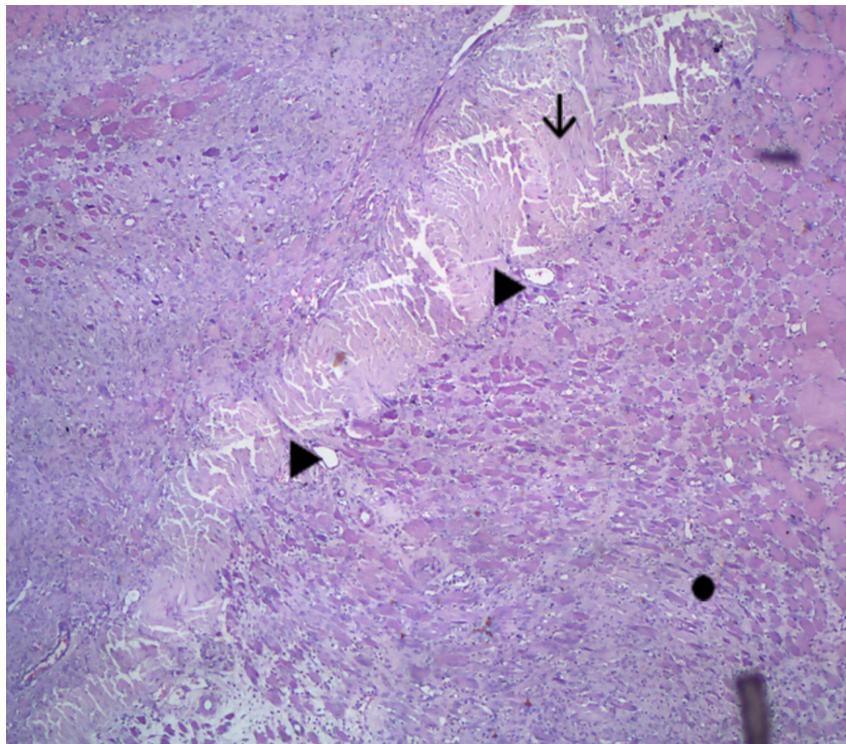


Figura 36 – Histologia do grupo fonoforese 7º dia. Apresentando infiltrado inflamatório (●); necrose (▶) e fibrose (∇). Aumento de 4x.

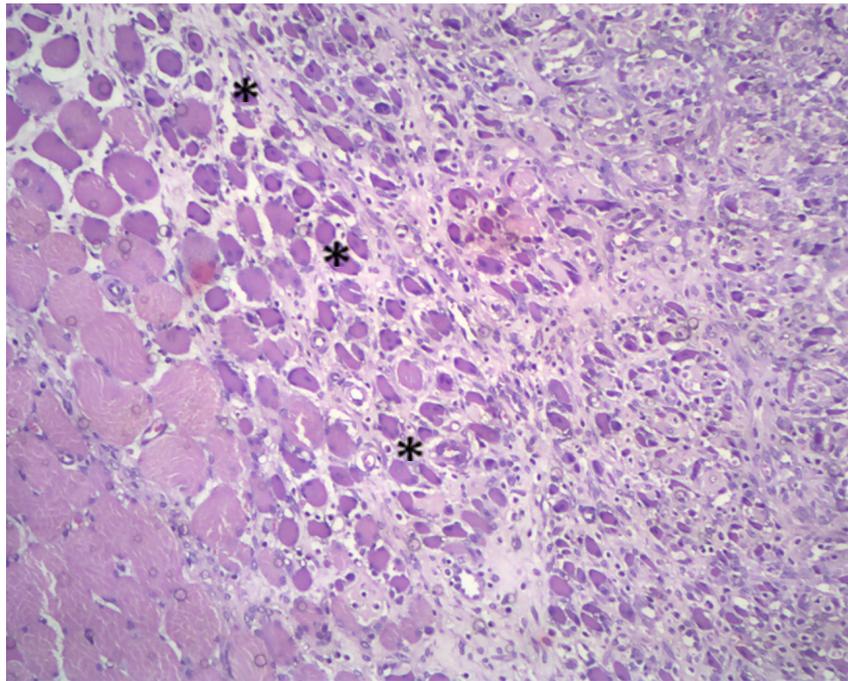


Figura 37 – Histologia do grupo controle 7º dia. Apresentando núcleos centralizados (*). Aumento de 10x.

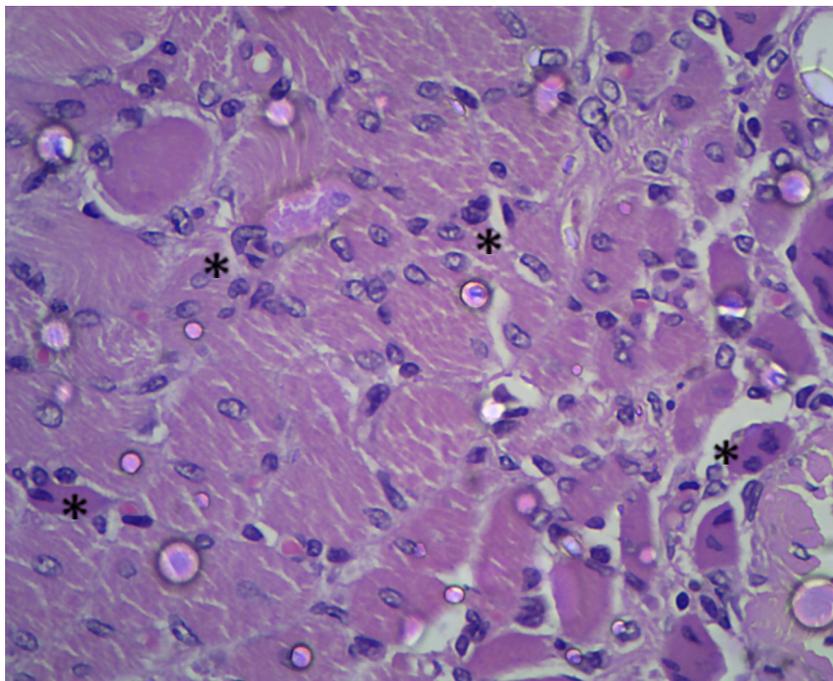


Figura 38 – Histologia do grupo US 7º dia. Apresentando núcleos centralizados (*) Aumento de 40x.

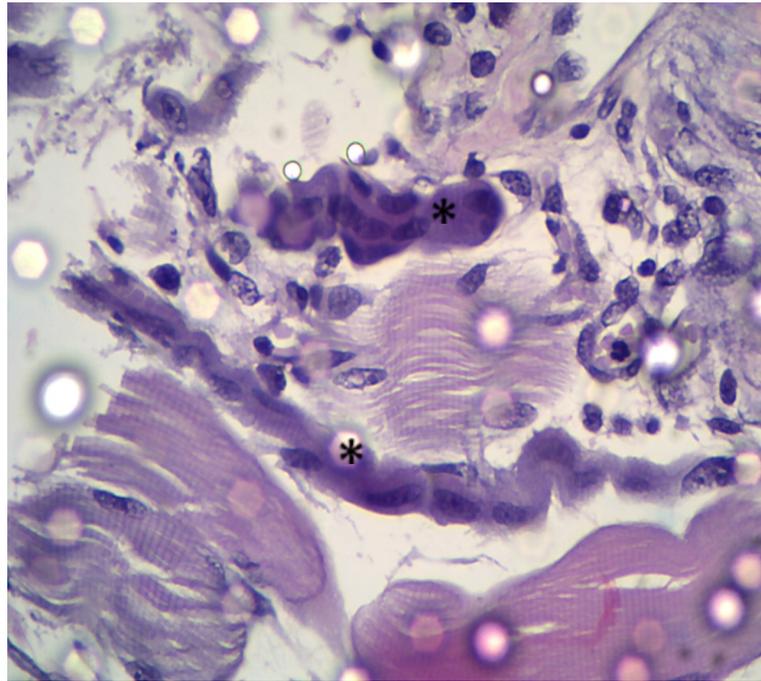


Figura 39 – Histologia do grupo tópico 7º dia. Apresentando núcleos centralizados (*). Aumento de 40x.

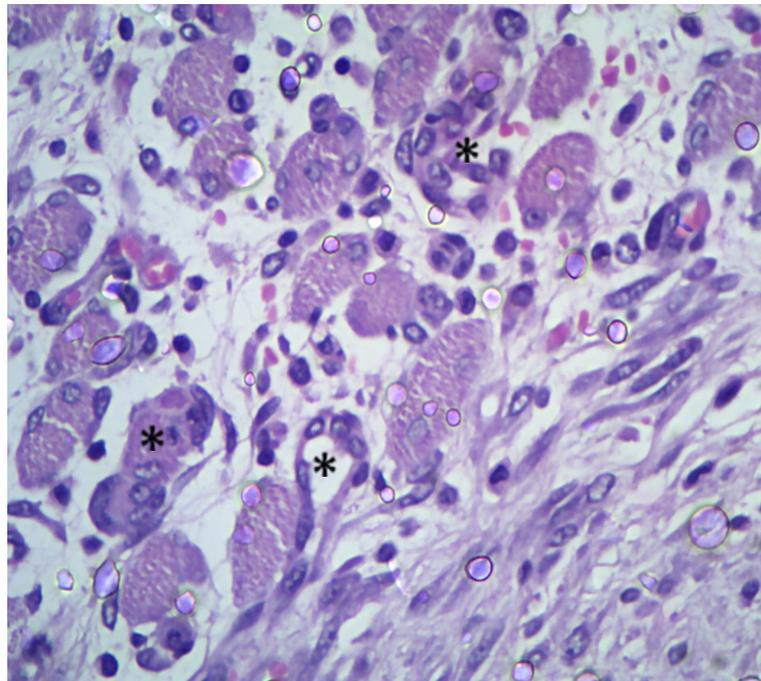


Figura 40 – Histologia do grupo Fonoforese 7º dia. Apresentando núcleos centralizados (*). Aumento de 40x.

Recomendamos estudos adicionais de permeação e de ação terapêutica no 14º e 21º dias após a lesão muscular, com continuação da aplicação das terapias até esses momentos. Com o

objetivo de fazer uma análise completa de todo o processo de recuperação de uma lesão muscular. Bem como a dosagem bioquímica para análise da toxicidade hepática e renal e a dosagem de marcadores inflamatórios.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que o gel fitoterápico de copaíba da espécie *C. duckei* administrado não foi tóxico para a pele em uma única aplicação nas concentrações testadas.

Quando utilizado por 21 dias consecutivos o gel fitoterápico de copaíba da espécie *C. duckei* apresentou irritativo para pele nas concentrações de 75% e 50% e na sua forma pura e cumulativa após 4 aplicações.

O gel de *C. duckei* a 10% apresentou transmissibilidade positiva para sua utilização por fonoforese não atenuando as ondas de US e foi capaz de promover a abertura do estrato córneo da pele após sua administração por fonoforese, permitindo a permeação dos princípios ativos da copaíba em estudo.

Quanto ao efeito terapêutico o gel fitoterápico de copaíba da espécie *C. duckei* 10% mostrou resultados mais eficazes para o processo de reparação muscular na fase inflamatória por via tópica, sendo seguido pelo tratamento por fonoforese.

O surgimento de núcleos centralizados foi mais adiantado ao utilizar o US para tratamento.

O tratamento de US pulsado 1MHz a 20%, com $0,6\text{W}/\text{cm}^2$ por um minuto indica a possibilidade de antecipação da formação de novas células musculares pela observação dos núcleos centralizados.

Mostraram-se positivos os benefícios da utilização do gel fitoterápico de *C. duckei* 10% no processo de reparação muscular.

REFERÊNCIAS

- ABED, R. A. *et al.* Alterações morfohistológicas em larvas de *aedes aegypti* (linnaeus, 1762) (diptera, culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (*leguminosae*). **Revista de Patologia Tropical**. Vol. 36 (1): 75-86. jan.-abr. 2007.
- ALFREDO, P.P., *et al.* Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: An experimental study. **Ultrasonics** 49 (2009) 466–471.
- ALFREDO, P. P. **Estudo experimental dos efeitos da fonoforese com *Arnica montana* sobre o processo de regeneração do músculo esquelético em ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ALFREDO, P.P. *et al.* Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: An experimental study. **Ultrasonics** 49 (2009) 466–471.
- AGNE, J. E. **Eletrotermoterapia Teoria e Prática**. Santa Maria: Pallotti, 2004.
- _____. **Eu sei Eletroterapia...** Santa Maria: Pallotti, 2009.
- ALMEIDA, E. B. **Estudo morfológico e morfométrico do efeito de filmes bioativos de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial de queimadura de terceiro grau em ratos**. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.
- ALMEIDA, M. R.; *et al.* Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. **Genetics and Molecular Biology**, 35, 3, 664-672 (2012). Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil.
- ALVES, A. N. **Influência da laserterapia de baixa potência na regeneração do músculo esquelético e no remodelamento da matriz extracelular após lesão aguda**. Dissertação (Mestrado em Ciências das Raebilitação) – Universidade Nove de Julho. São Paulo, SP. 2012.
- AMARAL, A.C., PARIZOTTO, N.A., SALVINI, T.F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration os skeletal muscle in mice. **Lasers Medical Sciense**. 16:44-51, 2001.
- ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba, PR. 2007.

ARAÚJO JÚNIOR, F.A. et al. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, n.1, p.93-9, 2005.

BALMASEDA JUNIOR, M.T. *et al.* Ultrasound therapy: a comparative study of different coupling media. **Arch Phys Med Rehabil.** 67: 14750. 1986

BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v.6, p. 85-97, 1987.

BATISTA, C. R. *et al.* **Produção sazonal do óleo-resina de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós.** Universidade Federal do Oeste do Pará, ICMBio. 2011.

BENTES-GAMA, M. M. *et al.* **Regeneração natural de copaíba (*Copaifera ssp.*) em uma floresta ombrófila aberta em Rondônia.** Anais do 1º Seminário do Projeto Kamukaia manejo sustentável de produtos florestais não-madeireiros na Amazônia. Rio Branco, Acre. Março de 2008.

BENTLEY, M.V.L.B. **Desenvolvimento de produtos farmacológicos contendo corticóides: avaliação da liberação e penetração transcutânea por metodologia *in vitro*.** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, SP: 1994.

BIAVATTI, M. W. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** Brazilian Journal of Pharmacognosy. 16(2): 230-235, Abr./Jun. 2006.

BOAROTO, J.A. **Identificação do sesquiterpeno β -cariofileno em óleo de copaíba utilizando espectroscopia Raman.** Mestrado em Bioengenharia. Universidade Camilo Castelo Branco. Instituto de Engenharia Biomédica. São Jose dos Campos-SP: 2014.

BOUWSTRA, J. A. *et.al.* Effect of N-alkyl-azocycloheptan-2-ones including Azone on the behaviour of stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.52, p. 47-54, 1989.

BRANCO, A.C.S.C. *et al.* Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde.** Volume 15. Número 2. Páginas 209-214. 2011

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança Farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** 2ª Versão. Brasília: 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Volume 1. Brasília, DF: 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia de orientação para registro de medicamentos fitoterápicos e registro e notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.** Brasília, DF: 2013. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/.../Guia+final+dicol+180614.pdf?... >. Acesso em: 09 de set. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** Brasília, DF: 2013.

BRASILEIRO, J. S.; ALVES, T. C.; ESCÓSSIA, C. C. Análise da transmissibilidade ultrassônica de medicamentos utilizados na prática da fonoforese. **Revista Brasileira de Fisioterapia.** Vol. 7, no. 2 (2003), 139-144.

BRITO, M. V. H. *et al.* Efeito dos óleos de andiroba e copaíba na miosite induzida em ratos. **Revista Paraense de Medicina** V.20 (2) abril - junho 2006.

BRITO, M. V. H. *et al.* Efeito do óleo de copaíba na função renal de ratos. **Revista Paraense de Medicina,** V. 15 (3) julho -setembro 2001. ISSN01015907

BOTELHO, N. M. *et al.* **Estudo morfológico do efeito subagudo de altas doses do óleo de copaíba em ratos.** Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará (UEPA). 2011

BYL, N. N. The Use of Ultrasound as an Enhancer for Transcutaneous Drug Delivery: Phonophoresis. **Physics therapy.** 1995; 75:539-553.

CABRAL, D., FIORINI, J.E., CARVALHO, J.C.T. **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e da ação cicatrizante in vivo do óleo de copaíba (Copaifera duckei Dwyer).** Resumo. I Simpósio de Pesquisa e V SEMIC – Seminário de Iniciação Científica da UNIFENAS. 2006.

CAMARGO, L. C. S. **Efeito antiinflamatório do extrato de *Zingiber officinale* aplicado por fonoforese sobre o edema de pata de ratos.** Dissertação (Pós-graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. 2006.

CAMERON, M. H.; MONROE, L. G. Relative Transmission of Ultrasound by Media Customarily Used for Phonophoresis. **Physics Therapy.** 1992; 72:142-148.

CÁRNIO, P.B. **Variação dos parâmetros físicos do campo ultra-sônico em fonoforese com diclofenaco gel.** Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos: São Paulo, 2006.

CARVALHO, J.C.T. *et al.* Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytother. Res.** 2005, 19, 946–950.

CERUTTI, D.G.U. **Estudo dos efeitos do ultra-som na veiculação de fitoterápicos através da análise da degradação da *Arnica Montana***. Dissertação (Pós-graduação em ambiente e desenvolvimento, Núcleo de eletrofotocímica e materiais poliméricos). Centro universitário UNIVATES. Lageado, 2009.

CHAN, Y.; *et al.* Using low-intensity pulsed ultrasound to improve muscle healing after laceration injury: an in vitro and in vivo study. **Ultrasound in Med. & Biol.**, Vol. 36, No. 5, pp. 743–751, 2010

CHORILLI, M. *et al.* Avaliação Histológica da Hipoderme de Suínos Submetida a Tratamento Mesoterápico com Tiratricol, Cafeína e Hialuronidase. **Acta Farmacêutica Bonaerense** 24 (1): 14-8 (2005).

CHORILLI, M. *et al.* Ensaio biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada.**, 2009; 30(1):19-30.

CHORILLI, M. *et al.* Transmissividade das ondas ultrassônicas em diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Farm.**, 88(3): 119-124, 2007.

CLARK, C.P. Alpha hydroxy acids in skin care. **Clin. Plast. Surg.**, v.23, p. 49-56, 1996.

CRISCO, J.J., *et al.* muscle contusion injury model. **Biomechanics, physiology, and histology.** **Am J Sports Med** 22, 702-710, 1994.

CURIO, M.; *et al.* Acute effect of *Copaifera reticulata* Ducke copaiba oil in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **The Journal of pharmacy and pharmacology.** Volume: 61 Edição: 8 Páginas: 1105-10. Ago. 2009.

DEUS, R.J.A. *et al.* Efeito fungitóxico in vitro do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais.** Botucatu, v.11, n.3, p.347-353, 2009.

DORNELES, F. S. *et al.* Susceptibility of *Trypanosoma evansi* in the Copaiba Oil: In Vitro Test and in Mice Experimentally Infected with the Parasite. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2013. 41: 1136. ISSN 1679-9216.

ENGEMANN, J. **Efeitos do ultra-som pulsado associado à gel DMSO sobre a via pró-inflamatória em modelo animal de lesão muscular.** Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Fisioterapia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2010.

FERNANDES, T.B.; REMOR, K.V.T. **Ensaio de irritação primária de pele (efeito agudo) - Avaliação da toxicidade dérmica do óleo de Copaíba.**

FERRARI . J. *et al.* Processo de regeneração na lesão muscular: Uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**. Curitiba, v.18, n.2, p. 63-71, 2005.

FRANCISCO, S.G. Uso do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) em inflamação ginecológica. **Femina**, v.33, n.2, p.89-93, 2005.

FREITAS, H. O. G. **Efeitos da administração do óleo de copaíba sobre o desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos: aspectos morfológicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília. Brasília: 2006.

FREIRE, D. C. B.; BRITO-FILHA, C. R. C.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa sp.*) e Copaíba (*Copaifera sp.*) sobre forídeo, pragas de colméias, (Diptera: Phoridae) na Amazônia Central. **Revista Acta Amazônica**. VOL. 36(3) 2006: 365 – 368.

FÔNSECA, S. G. C. **Farmacotécnica de fitoterápicos**. Departamento de Farmácia. UFC.

FUKUSHIMA K; BADLANI N; USAS A. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. **American journal of sports medicine** 29, 394-402, 2001.

GARCIA, Eduardo, A. C. **Biofísica**. São Paulo: Sarvier, 2000

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de Hematologia Veterinária**. São Paulo: Editora Varela, 2005.

GIESBRECHT, P.C. P. **Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato**. Dissertação. (Mestrado em ciência animal) - Centro Universitário Vila Velha, 2011.

GOUVÊA, C.M.C.P; VIEIRA, P.M.N; AMARAL, A.C. Efeito do ultra-som na recuperação de músculo tibial anterior de rato lesado. **Revista Universidade Alfenas**, v. 4, p. 165-173, Alfenas, 1998.

GROUNDS, M.D. Phagocytosis of necrotic muscle in muscle isografts is influenced by the strain, age, and sex of host mice. **The Journal of Pathology**, v. 153, 1987.

GUIMARÃES-SANTOS, A.; *et al.* Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. Volume: 2012 Páginas: 918174.

GUIRRO, R. *et al.* Dosimetria de aparelhos de ultra-som terapêutico utilizando balança semi-analítica. **Revista Brasileira Fisioterapia**. V oi. I, No. 2 (1996) 79-82.

GURGEL, C.B.F.M. **A fitoterapia indígena do Brasil colonial (os primeiros dois séculos)**. In: ENCONTRO REGIONAL DE HISTÓRIA, 11. 2004. Anais eletrônicos...Rio de Janeiro: UFF, 2004.

GURGEL, E.S.C. **Morfoanatomia, perfil químico e atividade alelopática de três espécies de Copaifera L. (*Leguminosae caesalpinoideae*) nativas da Amazônia.** Dissertação (Programa de pós-graduação em Botânica) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus – AM: 2009.

GURNEY, A.B. *et al.* Absorption of Hydrocortisone Acetate in Human Connective Tissue Using Phonophoresis. **Sports Physical Therapy.** Julho-agosto 2011.

GUTMANN, A. Z. **Fisioterapia Actual.** Barcelona: Fims, 1980.

GUYTON, Arthur C. **Tratado de fisiologia médica.** 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

HADGRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.184, p. 1-6, 1999.

HERRERO-JÁUREGUI, C.; GÁRCIA-FERNÁNDEZ, C.; CONZÁLEZ, M. A. C. **Ecologia da produção do óleoresina de Copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) numa área da Floresta Nacional do Tapajós, Belterra, Pará.** Anais do 1º Seminário do Projeto Kamukaia manejo sustentável de produtos florestais não-madeireiros na Amazônia. Rio Branco, Acre. Março de 2008.

HECK, M. C.; VIANA, L. A.; VICENTINI, V. E. P. Importância do óleo de *copaifera sp.* (COPAÍBA). **Revista Saúde e Biologia.**, v.7, n.1, p.82-90, jan./abr., 2012.

HILL, G.E.; FENWICK, S.; MATTHEWS, B.J. **Ultrasound in medicine & biology**, 1701–1706, 2005.

JESUS, G. S.; FERREIRA, A.S.; MENDONÇA, A. C. Fonoforese x Permeação cutânea. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v.19, n.4, p. 83-88, out./dez. 2006

JARVINEN, H.U.; TAH, E.T. Muscle Injuries. Biology and treatment. **The American Journal of Sports Medicine** 33, 123-129, 2005.

KITCHEN, S. B. **Eletroterapia de Clayton** – 11ª ed. São Paulo: Manole, 2002.

KOEKE, P. U. **Estudo comparativo da eficácia da fonoforese, do ultra-som terapêutico e da aplicação tópica de hidrocortisona no tratamento do tendão de rato no processo de reparo tecidual.** Dissertação de mestrado. Universidade de São Carlos – São Paulo. 2003.

KOEKE, P.U. *et al.* Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. **Ultrasound in Med. & Biol.**, Vol. 31, No. 3, pp. 345–350, 2005.

LAMEIRA, O.A. *et al.* Seasonal variation in the Volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer Growing Wild in the State of Para Brazil. **Journal of Essential Oil Research.** Vol.21, March/April 2009.

LEANDRO, L. M. *et al.* Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera spp.*) Oleoresins. **Molecules**. 2012. ISSN 1420-3049.

LI, G. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. **Physiological Research** 54, 193-199, 2005.

LIMA, C.S. **Aproveitamento de recursos naturais: estudo da performance reprodutiva com a aplicação do óleo de copaíba (*Copaifera duckei* Dwyer) veiculado em creme vaginal**. Dissertação (Mestrado em biodiversidade tropical) - Universidade Federal do Amapá. Macapa, AP: 2009.

LIMA, N.N. *et al.* **Influência da gramatura na resistência da linha de cola aos esforços de cisalhamento em painéis compensados de *Copaifera duckei* Dawyer e *Eperua oleifera* Ducke**. Revista Acta Amazônica. vol. 41(1) 2011: 83 – 90.

LIMA, N.N.; PIO, N. S. Avaliação da gramatura de cola na propriedade de flexão estática em painéis compensados de *Copaifera duckei* Dwyer e *Eperua oleifera* Ducke. **Revista Acta Amazônica**. vol. 37(3) 2007: 347 – 352.

LIMA, P. G. C.; COELHO-FERREIRA, M.; OLIVEIRA, R. Plantas medicinais em feiras e mercados públicos do Distrito Florestal Sustentável da BR-163, estado do Pará, Brasil. **Acta Botanica**. Brasilica25(2): 422-434. 2011.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: princípios e prática**. Ed. Manole, São Paulo, pp. 187-228, 2003.

LUCCA, L. G. **Avaliação da permeação cutânea de nanoemulsão contendo óleo de copaíba incorporada a hidrogéis**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

LUCCA, L. G. *et al.* **Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 104, p. 144–148, 2015.

LUCENA, Carlos. **Eletroterapia**. Curitiba: Lovise, 1991.

LUZ, M.M.M. Efeito do laser As-Ga-Al de baixa potência sobre o músculo gastrocnêmico de rato submetido à lesão mecânica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.

MACHADO, C.M. **Eletrotermoterapia prática**. 3ª ed., São Paulo: Pancast, 2001.

MACBRIER, N. M. *et al.* Reliability and validity of a novel muscle contusion device. **Journal of Athletic Training**. 2009; 44(3):275–278.

MAGALHÃES, A. A.; MARINHO, D. F. **Proposta de protocolo para investigações comparativas entre tratamentos fisioterapêuticos que envolvam lesões traumáticas em patas de ratos.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação em fisioterapia) – Universidade do Estado do Pará, Santarém, 2007.

MAGAUDDA, L.; *et al.* Effects of Physical Exercise on Skeletal Muscle Fiber: Ultrastructural and Molecular Aspects. **Basic Applied Myology**, v. 14, n. 1, p. 17-21, 2004.

MAIA FILHO, A.L.M.; *et al.* Comparative study of the topical application of aloe vera gel, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair in collagenase-induced rat tendinitis. **Ultrasound in Med. & Biol.**, Vol. 36, No. 10, pp. 1682-1690, 2010.

MAISTRO *et al.* In vivo evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology**, 28, 4, 833-838. 2005.

MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREIRA, J.F.; LIMA, H.C.L. **O gênero *copaifera* (leguminosae – caesalpinioideae) na Amazônia brasileira.** *Rodriguésia* 59 (3): 455-476. 2008.

MATSUDA, H., ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.36, p. 81-99, 1999.

MEDEIROS, B. J. S. **Avaliação da performance reprodutiva do óleo de copaíba (*Copaifera duckei* Dwyer) em ratas, linhagem wistar.** XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. 2012.

MEIDAN, V.M. *at al.* Phonophoresis of hydrocortisone with enhancers: an acoustically defined model. **International Journal of Pharmaceutics**. 170 (1998) 157–168

MELO, M.G.D. *et al.* Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v.8, n. 4, 2012.

MELLO, J.R.B. *et al.* Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Gossypium herbaceum* (Algodoeiro) em Ratos Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)** *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (1): 46-55 (2008).

MESQUITA, I.C. **Lesão muscular induzida por bupivacaína em linhagens de camundongos predispostos a perfil distinto de citocinas.** Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ. 2007.

MINAMOTO, V.B.; GRAZZIANO, C.R.; SALVINI, T.F. Effect of Single and Periodic Contusion on the Rat *soleus* Muscle at Different Stages of Regeneration. **The Anatomical Record**. 254:281–287 (1999).

MONTES, L.V. *et al.* Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Revista Natureza on line** 7 (2): 61- 67. [on line]. Publicado pela ESFA, 2009.

MOURA, W.A. **Ensaio farmacológico das atividades anti-inflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda da *Copaifera luetzelburgii*, Harm e *Sida santaremnensis*, Monteiro.** Universidade Federal do Piauí. Doutorado em Ciência Animal. Terezinha-PI: 2010.

MUNIZ, J.W.C. **Atividade anti-inflamatória do óleo-resina da copaifera reticulata em modelo inflamatório de edema de pata.** Dissertação (Doutorando em Neuroquímica Molecular e Celular). Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

NAGATA, Y.; *et al.* Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. **The Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 2, 245-253, 2006a.

NOGUEIRA, D. G. M. **Efeito do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização muscular e células satélites.** Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca. Franca, 2006.

NUNES, K.M. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L.** Mestrado em Ciência Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará. Belém-PA: 2008.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. 404. Adopted: 24th April 2002.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. "Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study". 410. Adopted: 12 May 1981.

OKUYAMA, S.S.K.; MORO, C.M.C. **Proposta de Padronização para o Preparo de Medicamentos na Farmácia Magistral: Formas Farmacêuticas Semi- Sólidas e Líquidas.**

OLIVEIRA, A.S. **Dermatotoxicidade: uma abordagem farmacêutica.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

OLIVEIRA, R. F.; PIRES, D. A. P.; SOARES, C. P. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on 1929 fibroblasts. **Archivos Medical Scientia**, 2011; 7, 2: 224-229.

OLIVEIRA, U. D. *et al.* Avaliação do ciclo celular de *Aspergillus nidulans* exposto ao extrato da planta *Copaifera officinalis* L. **Revista Saúde e Biologia**, v.1, n.2, p.42-7, 2005.

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. **Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.3, p.14-23, 2006.

- OLSSON, D.C. **Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada e contínua no processo cicatricial de ratos submetidos à celiotomia.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2005.
- ORELLANA, B. J. P.; KOBAYASHI, E. S. **Efeito da fonoforese por andiroba em edema induzido em ratos.** TCC (Graduação em Fisioterapia). 2006.
- PACHECO, T.A.R.C. *et al.* Antimicrobial activity of copaíba (Copaifera spp) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.123-4, 2006.
- PAIVA, F. P; MAFFILI, V. V; SANTOS, A. C. S. **Curso de manipulação de animais de laboratório.** Fundação Osvaldo Cruz, 2005.
- PARHAM, P. **O sistema imune.** Porto Alegre: Artmed, 2001.
- PARIZOTTO, N.A. *et al.* **Utilização da fonoforese em desordens músculo-esquelética: uma metanálise.** Revista Brasileira de Fisioterapia, 7 (1): 49-55. 2003
- PAULO, C.L. *et al.* Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. **Ultrasound in Med. & Biol.**, Vol. 36, No. 1, pp. 44–50, 2010.
- PERTILLE, A.; MACEDO, B.; OLIVEIRA, C. P. V. Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento com laser de baixa intensidade. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 16, n. 6, p. 495-501, nov./dez. 2012, ISSN 1413-3555.
- PIERI *et al.* Antimicrobial profile screening of two oils of Copaifera genus. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.64, n.1, p.241-244, 2012.
- PIERI *et al.* **Inhibition of *Escherichia colifrom* mastitic milk by copaiba oil.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1929-1934, 2011.
- PIERI, F.A., MUSSI, M.C., MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (Copaifera sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.4, p.465-472, 2009.
- PLENTZ, R.D.M. *et al.* Alterações hematológicas provocadas pelo ultrassom de 1MHz na forma contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. vol.12 no.6 São Carlos Nov./Dec. 2008 Epub Nov 30, 2008.
- POLAT, B.E. *et al.* Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope, and emerging trends. **Journal of Controlled Release** 152 (2011) 330–348
- RAMOS, M.F.S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fracção volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica.** 132p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, 2006.

RIBEIRO, R. **Efeito do ultra-som terapêutico pulsado na proliferação e atividade gelatinolítica de células musculares.** Dissertação (Pós-graduação em Ciências da Reabilitação) - Universidade Nove de Julho. São Paulo - SP, 2009.

RICOLDY, D.S. *et al.* Efeito do ultrassom associado ao gel de calêndula sobre a atividade reparadora em lesões musculares experimentais. *Acta Scientiarum. Health Sciences.* Maringá, v. 32, n. 2, p. 135-140, 2010.

RIGAMONTE AZEVEDO, O.C. *et al.* Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. *Revista Árvore*, v.30, n.4, p.583-91, 2006.

RIO, G.H.W. **Atividade anti-inflamatória, toxicidade e aspectos químicos do óleo-resina de copaíba, proveniente de diferentes espécies, e suas respectivas frações.** Doutorado Doutorado em Ciências Farmacêuticas. São Paulo-SP: 2001. (2001)

ROBINSON, A. J. SNYDER-MACKLER, L. **Eletrofisiologia clínica – eletroterapia e teste eletrofisiológico.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

ROCHA, R. S. B.; CAVALLIERI, A. G. Lesão, Plasticidade e Reabilitação do Sistema Muscular. *Revista brasileira Ciência e Movimento*, v. 15, n. 2, 2007.

ROSIM, G. C. **Análise da influência do ultra-som terapêutico na penetração transcutânea de diclofenaco sódico em humanos sadios.** Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

SACHETTI, C. G. **Avaliação toxicológica do óleo-resina de copaíba em ratos: estudos de toxicidade aguda, neurotoxicidade e embriofetotoxicidade.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília. Brasília, DF: 2010.

SACHETTI, C.G. *et al.* Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food Chem Toxicol (Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association).** Volume: 49. Edição: 5, pg. 1080-5. Maio, 2011.

SILVA, D.T.C. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e mutagênica de microemulsão tópica contendo óleo de copaíba.** Universidade Estadual da Paraíba. TCC de graduação em Farmácia. Campina Grande-PB: 2014.

SANTOS, A. O. *et. al.* **Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(1): 59-64, February 2013.

SCORISA, J. M. **Avaliação do Potencial Irritativo e Comedogênico na Pele de Sistemas Microemulsionados Associados ou Não ao Ultra-Som Terapêutico.**

SHINOHARA, A. L. **Células satélites e fusos neuromusculares em músculos estriados de ratos desnervados por longo período.** Dissertação (Doutorado de Ciências Odontológicas Aplicadas) - Faculdade de Odontologia de Baurú, Universidade de São Paulo, Baurú, 2012.

SILVA, L.N. *et al.* Aspectos socioeconômicos da produção extrativista de óleos de andiroba e de copaíba na floresta nacional do Tapajós, Estado do Pará. **Revista Ciências Agrárias**, v.53, n.1, p.12-23, Jan/Jun 2010.

SILVA, J.A. *et al.* Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista Ciências Farmacêuticas Básicas Aplicadas**, 2010; 31(3):125-131. ISSN 1808-4532.

SILVA, A.D.L.; SILVA, C.D.B.; CATÃO, M.H.C.V. Avaliação do pH de substâncias clareadoras caseiras a 10%, 16% e 22%. **Revista Dentística on line** – ano 11, número 23 (2012) ISSN 1518-4889.

SILVA, D.A.; IMAMURA, P.M.; ROMERO, A.L. **Estudo da autenticidade de óleos-resina de copaíba comerciais utilizando métodos analíticos convencionais.** VII Encontro de produção científica e tecnológica. Setembro de 2012.

SILVEIRA, P.C.L. *et al.* Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. **Ultrasound in Med. & Biol.**, Vol. 36, No. 1, pp. 44–50, 2010.

SILVA, E. L.; MENEZES, E. M. **Metodologia da Pesquisa e Elaboração de Dissertação.** 3. ed. rev. e atual. Florianópolis: Laboratório de Ensino à Distância da UFSC, 2001.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas as plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brazilian Journal of Pharmacognosy 18(4): 618-626, Out./Dez. 2008.

SOUZA FILHO, A P.S. Atividade alelopática de extratos brutos de três espécies de *Copaifera (leguminosae-caesalpinioideae)*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, n. 4, p. 743-751, 2010.

SOUZA, F.D.R. **O manejo do óleo-resina de *Copaifera spp.* realizado pelas etnias Arara (Karo rap) e Gavião (Ikolen) na Terra Indígena Igarapé Lourdes, Rondônia.** Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, AM: 2010.

SOUZA, J. *et al.* Effect of phonophoresis on skin permeation of commercial anti-inflammatory gels: sodium diclofenac and ketoprofen. **Ultrasound in Med. & Biol.**, Vol. 39, No. 9, pp. 1623–1630, 2013.

SOUZA, J.; GOTTFRIED, C. Muscle injury: Review of experimental models. **Journal of Electromyography and Kinesiology** 23 (2013) 1253–1260

SRIKUEA, R. *et al.* Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** (2010) 37, 1078–1086.

STARKEY C. **Recursos terapêuticos em fisioterapia**. Ed. Manole, São Paulo, pp. 304-311, 2002.

TASSINARY, J. A.; BIANCHETTI, P.; REMPEL, C. Avaliação dos efeitos do ultrassom terapêutico sobre a cafeína e verificação da liberação em sistema de difusão vertical. **Química Nova**, Vol. 34, No. 9, 1539-1543, 2011.

TAVARES, J. P. *et al.* Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 16(3): 350-356, Jul./Set. 2006.

TAYLOR, C.R. *et al.* Photaging. Photodamaged. Photoprotection. **Journal of the american academy of dermatology**, St. Louis, v.22, p. 1-11, 1990.

TOMAZONI, S. S. **Efeito da sinvastatina na lesão induzida por estiramento passivo em ratos**. Dissertação (Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.

VALENTE, R.H. *et al.* Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 19(2B): 557-560, Abr./Jun. 2009.

VEIGA JR, V.F.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, 20(6), 1997.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química nova**, v.25, n.2, p.273-86, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

VICTOR, E. G. *et al.* Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. **Journal of Nanobiotechnology**, 2012.

VIEIRA *et al.* Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 28(8):358-366, agosto 2008.

VILANOVA, C.M.A. *et al.* Evaluation of oil-resin activity of *Copaifera* sp. on gastric emptying in *Rattus norvegicus*. **Emir. J. Food Agric**. 2013. 25 (5): 394-39.

WARREN, C.G.; KOBLASKI, J.N.; SIGELMANN, R.A. Ultrasound coupling media: their relative transmissivity. **Arch Phys Med Rehabil.** 57: 218-22. 1976

WILKIN, L.D.; MERRICK, M.A.; KIRBY, T.E. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. **International Journal of sports Med** 25, 73-77, 2004.

ANEXO A – Certificado de aprovação CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFOPA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Fonoforese com copaíba: Análise do efeito anti-inflamatório e de reparação muscular", protocolado sob o número Nº 09007-2013, utilizando 100 (cem) ratos heterogênicos, sob a responsabilidade da professora Dra. Adriana Caroprezo Morini, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal do Oeste do Pará.



Santarém, 19 de dezembro de 2013.

Antonio Carlos Morini
PRESIDENTE CEUA - UFOPA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA

Adriana Caroprezo Morini
 Presidente CEUA
 UFOPA

CEUA/UFOPA instituída pela portaria nº 15 de 11 de janeiro de 2013 e credenciada junto ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Deferimento publicado no Diário oficial da União Nº 187, 26 de setembro de 2013. CIAEP: 01.0065.2013

ANEXO B - Autorização SISBIO/ICMBio



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44266-1	Data da Emissão: 16/05/2014 17:12	Data para Revalidação*: 15/06/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Daliane Ferreira Marinho	CPF: 772.104.762-53
Título do Projeto: Fonoforese com copaiba: Análise do efeito anti-inflamatório e de reparação muscular.	
Nome da Instituição: Universidade Federal do Oeste do Pará	CNPJ: 11.118.393/0001-59

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 45231849



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44266-2	Data da Emissão: 16/04/2015 10:16	Data para Revalidação*: 15/05/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Daliane Ferreira Marinho	CPF: 772.104.762-53
Título do Projeto: Fonoforese com copaiba: Análise do efeito anti-inflamatório e de reparação muscular.	
Nome da Instituição: Universidade Federal do Oeste do Pará	CNPJ: 11.118.393/0001-59

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 57739794



Página 1/3

ANEXO C – Técnica de Caracterização química por cromatografia gasosa com espectrometria de massa.

Copaifera duckei (Cop9c-B and Cop9s-B)

EXPERIMENTAL

Gas chromatography (GC-FID)

The gas chromatography (GC) analyses were carried out using an Agilent Technologies 6890N GC-FID system, equipped with DB-5 capillary column (30m x 0.25 mm; film thickness 0.25 mm) and connected to a flame ionization detector (FID). The injector and detector temperatures were set to 280°C. The carrier gas was helium, at a flow rate of 1.3 mL/min. The thermal programmer was 50-300°C at a rate of 5°C/min. Two replicates of samples were processed in the same way. Component relative concentrations were calculated based on GC peak areas without using correction factors. The injection volume of the *Copaifera duckei* oil (dry and rainy season) essential was 1 µL (Boligon et al., 2013).

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

GC-MS analyses were performed on a Agilent Technologies AutoSystem XL GC-MS system operating in the EI mode at 70 eV, equipped with a split/splitless injector (250°C). The transfer line temperature was 280°C. Helium was used as carrier gas (1.5mL/min) and the capillary columns used were an HP 5MS (30m x 0.25 mm; film thickness 0.25 mm) and an HP Innowax (30m x 0.32mm i.d., film thickness 0.50 mm). The temperature programme was the same as that used for the GC analyses. The injected volume was 1 µL of the essential oil.

Identification of the components

Identification of the constituents of *Copaifera duckei* essential oil was performed on the basis of retention index (RI), determined with reference of the homologous series of *n*-alkanes, C₇-C₃₀, under identical experimental conditions, comparing with the mass spectra library search (NIST and Wiley), and with the mass spectra literature data Adams (1995). The relative amounts of individual components were calculated based on the CG peak area (FID response).

ANEXO D - Protocolo de manipulação do gel de *C.duckei* 10% com gel base de carbopol - Farmácia de manipulação Bioativa.

POP 56- Gel base de carbopol.

1. Objetivos: Definir os procedimentos para produção de bases galênicas, garantindo estabilidade e a ausência de partículas e microrganismos.

2. Alcance: Farmacêutico responsável técnico e substituto, técnico de laboratório.

3. Responsabilidades: Farmacêuticos.

4. Definições:

Gel de carbopol: Gel fluído incolor, transparente. Este veículo é incompatível com resorcina, fenol, ácidos fortes e eletrólitos em altas concentrações.

5. Precauções:

- Pesquisar todas as substâncias em um mesmo recipiente.
- O pH deve ficar entre 6,5 e 7,0.
- O pH da base inicia-se alto e deve ser ajustado com trietanolamida.
- Os ativos necessitam de no mínimo 12h de repouso, sem incorporação.

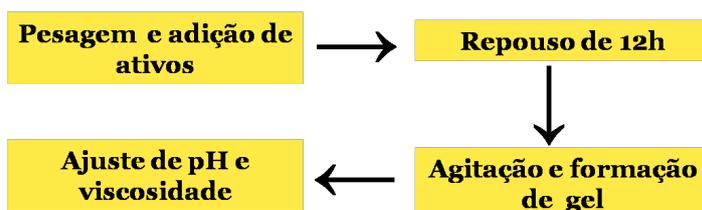
6. Materiais necessários:

- Bastão de plástico;
- Calculadora;
- Espátula pão-duro;
- Baker de plástico de 4litros;
- Balança;
- Agitador.

7. Procedimentos:

- 7.1 Pesquisar 1,2% da quantidade suficiente para produzir a base de carbopol;
- 7.2 Pesquisar 3% da quantidade suficiente para produzir a base de propilenoglicol;
- 7.3 Pesquisar 0,5% da quantidade suficiente para produzir a base de neolone;
- 7.4 Pesquisar copaíba 10%;
- 7.5 Pesquisar 95,3% da quantidade suficiente para produzir a base de água destilada;
- 7.6 Pesquisar todos os ativos em um Becker de 4L, tampar e deixar em repouso de no mínimo 12h;
- 7.7 Após o repouso homogeneizar, com auxílio de espátulas, em agitação moderada até a incorporação dos ativos e formação completa de gel;
- 7.8 Verificar e ajustar o pH e a viscosidade com trietanolamida.

8. Fluxograma:



ANEXO E – Laudo técnico da Farmácia de manipulação Bioativa quanto à preparação do Gel de copaíba (*Copaifera Duckei*) 10%.

Bio Ativa Farmácia de Manipulação Ltda
CNPJ: 07.295.260/0001-80
Insc. Est. 15.245.188-9
Av. Mendonça Furtado, 1695 - Santa Clara
Santarém-PA CEP: 66.205-100
Tel: (91)3523-5193 Fax: 3523-5056

BIOATIVA FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO LTDA, CNPJ: 07.295.260.0001/80, SITUADA NA AVENIDA MENDONÇA FURTADO Nº 1695, VEM POR MEIO DESTA, INFORMA A SENHORA DALIANE FERREIRA MARINHO, O PROCETIMENTO UTILIZADO NA PREPARAÇÃO DO GEL DE COPAÍBA (*COPAIFERA DUCKEI*) 10%.

COMPOSIÇÃO:
CARBOPOL 1,2%;
PROPILENOGLICOL 3%;
NEOLONE 0,5%;
COPAÍBA (*COPAIFERA DUCKEI*) 10%;
ÁGUA DEONIZADA QSP 30 GRAMAS.

MODO DE PREPARO:
PESAR TODOS OS ATIVOS (CARBOPOL 0,36 G, PROPILENOGLICOL 0,9 ML, NEOLONE 0,15 ML, COPAIBA 3 ML, ÁGUA DEONIZADA QSP 25,59 ML) EM UM BÉQUER DE PLÁSTICO DE 50ML, TAMPAR E DEIXAR EM REPOUSO POR NO MÍNIMO 1 HORAS;
APÓS O REPOUSO HOMOGENEIZAR, COM AUXÍLIO DO AGITADOR E A ESPÁTULAS, DEIXAR EM AGITAÇÃO MODERADA PARA INCORPORAÇÃO DOS ATIVOS, ATÉ FORMAÇÃO COMPLETA DO GEL;
VERIFICAR E AJUSTAR O PH (6,5) E A VISCOSIDADE COM TRIETANOLAMIDA.

